

Attachment  
JAPAN  
AA  
(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/21786 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/02, 1/68, A61K 38/10, 38/17, A61P 25/28, 43/00  
(72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 西本征央 (NISHIMOTO, Ikuo) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06313  
(22) 国際出願日: 2000年9月14日 (14.09.2000)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願平11/264679 1999年9月17日 (17.09.1999) JP  
特願2000/201456 2000年6月29日 (29.06.2000) JP  
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人 慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).  
(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).  
(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.  
(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

/続葉有

(54) Title: METHOD OF SCREENING DISEASE DEPRESSANT GENE

(54) 発明の名称: 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a disease depressant gene and a disease depressant polypeptide and a method of examining the same. A gene having a depressant effect on disease symptoms can be successfully cloned by screening a cDNA expression library having nucleic acids originating in an organism suffering from a disease in association with cell death integrated therein. By using these nucleic acids and polypeptides encoded thereby, the depressant effects on the disease are examined. Thus, a disease depressant gene can be efficiently isolated and selected by screening nucleic acids or polypeptides originating in an organism suffering from a disease in association with cell death.

(57) 要約:

本発明は疾患抑制遺伝子および疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法および検査方法を提供する。細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸を組み込んだcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、疾患症状に対する抑制効果を有する遺伝子をクローニングすることに成功した。また、該核酸およびそれがコードするポリペプチドを用いて、疾患に対する抑制効果の検査を行った。細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドをスクリーニングすることにより、疾患に対する抑制遺伝子を効率良く単離、選別することが可能となる。

WO 01/21786 A1



AZ, BY, KG; KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

## 明細書

## 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法

技術分野

本発明は疾患抑制遺伝子および疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法に関する。

背景技術

ヒトゲノムの解析が進展するにつれ、さまざまな疾患に関連する遺伝子が同定されている。これらの疾患関連遺伝子の解析により、これらの疾患において、疾患を惹起する原因遺伝子(群)の作用（もしくは疾患に関する正常遺伝子の異常な作用）と、疾患に対して抑制的に働く遺伝子(群)の作用との複雑な関連性が解明されつつある。すなわちヒトに発生するほとんどすべての疾患は、疾患を惹起する異常遺伝子の作用（もしくは疾患に関する正常遺伝子の異常な作用）とその作用に拮抗する正常の抑制遺伝子との作用均衡の破綻に基づいて発症すると考えられる。このような考え方は、胃潰瘍から神経変性疾患にいたるまで、ほぼすべての疾患に適用できる考え方である。これは、言い換えれば、大部分の疾患について、これを抑制する正常の遺伝子（もしくは疾患抑制遺伝子）が遺伝子ゲノム上に存在する可能性を示唆している。そのような遺伝子を効率的に探索する方法が開発されれば、治療法が見出されていない難治性疾患を含む、様々なヒト疾患について特効的な治療効果を示す遺伝子を発見、同定することができ、もたらされる有益性は疑う余地がない。

従来、特定の疾患に対する抑制遺伝子をスクリーニングするには、該当疾患の原因遺伝子が持つ生化学的な機能を指標に、これを抑制する分子を探索する手法が多く用いられてきた。しかし、そのような方法は、疾患原因遺伝子が持つ生化

学的機能が不明の場合は適用できない。また、仮に生化学的機能が同定されても、その機能が疾患発症の直接原因でない場合は、この機能を基にした薬剤の探索が、疾患を治療できる分子に直接結びつかない可能性もある。実際は、ある遺伝子が、疫学的、遺伝学的検討、あるいはその他の研究から、特定の疾患の原因遺伝子であることが明かとなつても、その遺伝子の生化学的機能を同定できないことが多い、また、仮に同定できたとしても、同定された機能が疾患発症の直接原因であるか否かを明らかにすることは更に困難である。例えば、パーキンソン病の同定された遺伝子の一つに  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -synuclein) という遺伝子がある (Polymeropoulos, M.H. et al., 1997, Science 276: 2045-2047)。この遺伝子産物に突然変異が生じるとパーキンソン病が発症することが確定的であるが、 $\alpha$ -シヌクレインの生化学的な機能は今尚、不明である。あるいは、ATMという Ataxia telangiectasia (毛細血管拡張を伴う脊髄小脳変性症) の原因遺伝子は、PI3キナーゼ様活性をもつことが唯一の知られた生化学的機能であるが、この生化学的機能異常が該当疾患発症の原因であるか否かは全く不明である。このように、単に疾患原因遺伝子が同定されただけでは、これを基に疾患に対する治療分子を開発することは著しく困難である。

疾患抑制分子を得るために、より機能的な方法でスクリーニングを試みる系が開発されている。その1つは疾患原因遺伝子が惹起する細胞死を抑制する遺伝子や分子を探索するスクリーニング方法であり、これは従来、デストラップ法 (D' Adamio L et al., Semin. Immunol. 1997; 9:17-23) として知られている。しかししながら、単に従来のデストラップ法を用いるだけではスクリーニングの効率が著しく低く、有効な方法とはなり得なかった。

上述のように、ヒトに発生するほとんどすべての疾患は、疾患を惹起する異常遺伝子の作用（もしくは疾患に関する正常遺伝子の異常な作用）とその作用に拮抗する正常遺伝子または疾患抑制遺伝子との作用均衡の破綻に基づいて発症すると考えられるので、大部分の疾患について、これを抑制する遺伝子がゲノム上

に存在している可能性は高い。従って、デストラップ法を用いて、ヒト遺伝子ゲノムをカバーするcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、理論的には疾患抑制遺伝子を発見できる可能性は存在する。しかしながら、実際にこれを行っても、広大なゲノムの中からそのような遺伝子を見出すことは極めて困難であり、実際、デストラップ法の確立後数年を経ても、この方法を用いて疾患抑制遺伝子は発見されていない。疾患抑制遺伝子をより効率的に検索できる方法が求められている。

### 発明の開示

本発明は、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドを効率的にスクリーニングする方法を提供することを課題とする。さらに本発明は、疾患抑制遺伝子およびポリペプチドの検査方法を提供することを課題とする。

上記課題を解決するため、本発明者は、細胞死を病態（の中心もしくは一部）とする疾患、すなわち細胞死を伴う疾患を対象に、この疾患の抑制遺伝子を効率的に検索する方法の開発を試みた。本発明者は、疾患抑制遺伝子をより効率的に検索するためには、検索の対象として単なるcDNAライブラリーではなく、疾患抑制候補遺伝子がより濃縮された集団を用いることが重要であると考えた。細胞死を伴う疾患においては、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織では、患部において細胞変性が生じる。通常、疾患状態にあるこのような臓器や組織は、疾患原因因子の探索の対象とはなっても、疾患抑制遺伝子を検索する対象とは考え難い。ここで本発明者は、細胞死を伴う疾患において、患部に含まれる細胞は必ずしも全てが細胞死を起しているわけではないことに注目した。また、患部周辺の比較的症状が軽度の組織や正常組織には、必ずしも疾患の原因が存在していないわけではなく、疾患原因が存在しているにも関わらず症状を発症しない可能性があると考えた。すなわち、正常組織が疾患を発症していないのは一見当然に見えるが、患部周辺の組織は疾患の発症を抑制する疾患抑制遺伝子を十分に発現しているために疾患を発症しないとも考えられるのである。このよ

うな考えに基づけば、疾患患部またはその周辺の組織からmRNAを調製し、これを基にcDNAライブラリーを作製すれば、疾患抑制遺伝子が濃縮されたライブラリーを構築できるはずである。

そこでこれを実証するため、本発明者は、細胞死を伴う疾患としてアルツハイマー病を例に、疾患抑制遺伝子のスクリーニングを試みた。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、効果的な治療法が確立されていない脳神経疾患の1つである。ADは、臨床的には進行性の記憶喪失および認知障害、病理学的には広範囲の神経喪失、神経細胞内集積物(intraneuronal tangles)、およびコンゴーレッドに高親和性の核 (conophilic dence core) を持つ細胞外老人斑により特徴付けられる。早発性の家族性AD (FAD) を引き起こす遺伝子として、これまでに V642I/F/G APP (数字は 695アミノ酸を持つAPPである APP<sub>695</sub> に対応する)、K595N/M596L APP (NL-APP)、プレセニリン(PS)-1変異体、およびPS-2変異体が報告されている (Shastry, B.S. and Giblin, F.J. (1999) Brain Res. Bull. 48, 121-127)。これらの遺伝子の発現は、神経細胞株または初代培養神経等において細胞死を引き起こす(Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352; Zhao, B. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 47, 253-263; Luo, J. J. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 55, 629-42; Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713; Wolozin, B. et al. (1998) Neurobiol. Aging 19, S23-27; Guo, Q. et al. (1996) Neuroreport 8, 379-83; Zhang, Z. et al. (1998) Nature 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96., 4125-30)。アルツハイマー病の臨床症状の多くは、進行性の神経細胞死により説明できることが一般に受け入れられており、ADにおける神経細胞死発症の病理機構を解明し、これを防ぐことは、これまでにない有効なAD治療法を確立するために必須の課題である。

本発明者はこれまでに、家族性アルツハイマー病型変異 V642I アミロイド前駆体蛋白質 (V642I APP) を誘導的に発現する神経細胞系 (F11/EcR/V642I) を確立している (国際公開番号 WO00/14204参照)。この系では、V642I APPが F11神経細

胞においてエクダイソン処理に応答して発現する。F11/EcR/V642I 細胞をエクダイソンと2~3日インキュベートすることにより、ほぼ全ての細胞が細胞死を起こすが、V642I APPを発現させない対照のインキュベーションではごく少数の細胞が細胞死を起こすに過ぎない。本発明者は、このF11/EcR/V642I 細胞を、V642I APPにより誘導される神経細胞に対するアンタゴニストとして作用する遺伝子の検索に利用した。

まず、孤発性アルツハイマー病と診断された患者由来の後頭葉よりポリA<sup>+</sup> RNAを調製した。大脳を神経細胞死の主座とするアルツハイマー病において、後頭葉は神経障害をほとんど受けない部位である。ポリA<sup>+</sup> RNAをcDNAに逆転写した後、発現ベクターに組み込みライブラリーを構築した。これを上記 F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクションし、エクダイソンによりV642I APPの発現を誘導した。72 時間後に神経細胞死から生き残った細胞からプラスミドを回収した。このデストラップ法によるスクリーニング操作を繰り返し行った結果、本発明者は、V642I APP による神経細胞死を保護する複数の遺伝子を同定することに成功した。

単離された遺伝子の1つである Humanin (HN) cDNAは、新規な24アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ADに関連する神経細胞死、すなわち、既知の全てのタイプの早発型家族性AD遺伝子 [V642I APP、K595N/M596L APP、M146L プレセニリン(PS)-1、および N141I PS-2] およびA $\beta$ 1-43により誘導される神経細胞死を抑制することが判明した。HN mRNA は中枢神経系およびそれ以外の幾つかの器官で産生されていた。HN cDNAを神経細胞にトランスフェクションしたところ、産生されたペプチドは培養液中に分泌されることが判明した。この培養上清には、V642I APPによる神経細胞死からの有意な保護を示すのに十分な活性が含まれていた。合成 HN ポリペプチドもまた、4種のAD遺伝子に対して同様の用量-応答特性で神経保護作用を示した。

このように、本発明者は、細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来の試料をスクリーニングすることにより、該疾患に対する抑制遺伝子を得ることができること

を実証した。本発明者が実施したこの方法は、アルツハイマー病に限らず細胞死を病態の一部とする疾患すべてに適用できる。すなわち本発明により、細胞死を伴う様々な疾患に対する抑制遺伝子を高い効率でスクリーニングすることが可能となる。また細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来のポリペプチドを含む試料を用いれば、疾患抑制遺伝子をスクリーニングする場合と同様に、疾患抑制ポリペプチドをスクリーニングすることも可能である。また、本発明者は、細胞死を伴う疾患に罹患した患者由来の核酸および該核酸がコードするポリペプチド、並びにその改変体を用いて、疾患に対する抑制効果の試験を行った。これと同様の検査は、細胞死を伴う他の疾患に罹患した患者由来の試料に対しても適用することができ、これにより該疾患に対する抑制効果を検査することができる。スクリーニングや検査により得られる遺伝子やポリペプチドは、疾患に対する治療に用いられる他、新たな医薬品開発の標的分子として利用され得る。本発明は細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法、および疾患抑制遺伝子およびポリペプチドの検査方法に関し、より具体的には、

(1) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法、

(2) 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む方法、

(3) 疾患抑制ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法、

(4) 工程 (a) あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程 (b) において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、(2) または (3) に記載の方法、

(5) 疾患が脳神経系疾患である、(1) から (4) のいずれかに記載の方法、

(6) 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、(5) に記載の方法、

(7) 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、(1) から (6) のいずれかに記載の方法、

(8) 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法、

(9) 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法、

(10) 工程 (a) あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を

誘導し、工程（b）において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、（8）または（9）に記載の方法、

（11）疾患が脳神経系疾患である、（8）から（10）のいずれかに記載の方法

（12）脳神経系疾患がアルツハイマー病である、（11）に記載の方法、

（13）核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、（8）から（12）のいずれかに記載の方法、に関する。

本発明は、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法を提供する。また、本発明は、該疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを用いて、該疾患に対する抑制効果を検査する方法を提供する。細胞死を伴う限り、本発明のスクリーニング方法または検査方法が適用され得る疾患に特に制限はない。このような疾患には、アポトーシスおよび／またはネクローシスを惹起する疾患が含まれる。また、細胞変性を伴う疾患が含まれる。

「疾患に罹患した生物」には、疾患症状を発症した生物、および明白な症状を呈していないとも、疾患の原因となる因子（もしくは要因）を有する生物が含まれる。例えば、疾患の原因遺伝子に変異を有していたり、発現に異常がある生物は、本発明において「疾患に罹患した生物」に含まれる。また、人為的に疾患状態を再現させたモデル動物なども含まれる。このようなモデル生物は、疾患原因となる因子を投与したり、疾患原因遺伝子の遺伝子操作などにより作製することができる。また本発明において「生物」は、個体および個体から分離された臓器や組織などの培養物が含まれる。これらの生物は遺伝的に改変されたものであってもよい。また、臓器や組織は他個体に移植されたものであってもよい。

本発明の方法を適用する対象となり得る疾患としては、細胞死を病態の中心、もしくは一部とするすべての疾患が挙げられる。具体的には、例えば神経疾患に

においては、すべての神経変性疾患、HIVを含むウィルスなどの外的因子による脳炎もしくは脳症、自己免疫機転のような内的因子による脳炎を含む。対象となる神経変性疾患は更に、2つに分類が可能である。一方が、特定の領域の神経細胞に変性が発生する疾患であり、他方が、広範囲の領域の神経細胞に変性が発生する疾患である。例えば、パーキンソン病は、大脳基底核黒質の神経細胞死によって疾患が引き起こされる為、前者に属する神経変性疾患である。この他、大脳基底核被殻および線条体に神経細胞死が発生するハンチントン病、網膜神経細胞に細胞死が発生する網膜色素変性症、脊髄神経細胞の細胞死が原因である筋萎縮性側索硬化症、小脳神経細胞に細胞死が発生する脊髄小脳変性症などが挙げられる。後者に属する神経変性疾患の例の代表はアルツハイマー病である。その他、び漫性レビー小体病、ピック病、あるいは前側頭葉痴呆症、更には、アルコール性脳症を含む。非神経疾患では、肺胞上皮細胞死が病態にある間質性肺炎、あるいは肺線維症、肝実質細胞死に起因する肝硬変症などがその代表であるが、その他に、腎硬化症、甲状腺機能低下症、動脈硬化症等も含まれる。

このように、本発明の方法は、細胞死を伴う疾患であればその適用対象は特に制限はないが、特に脳神経系疾患における抑制遺伝子または抑制ポリペプチドの検索ために好適に用いられる。脳神経系疾患とは、脳および／または神経系の障害を惹起する疾患を言う。代表的な脳神経系疾患としては、特に、上記のアルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている (I. Nishimoto et al., 1997, *Adv. Pharmacol.*, 41: 337-368)。この細胞死には、APP (I. Nishimoto et al., 1998, *Neurobiol. Aging.*, 19: S33-S38) やプレセニリン (Nishimura et al., 1999, *Clin. Genet.* 55: 219-225) のある種の活性化が関与していることが示唆されている。また、この細胞死には ApoE が関与していることも示唆されている (Namba, Y. et al., *Brain Res.* 541:163-166 (1991); Saunders, A.M. et al., *Neurology* 43:1467-1472 (1993); Corder, E.H. et al., *Science* 261:921-923 (1993); Ueki,

A. et al., *Neurosci. Lett.* 163:166-168 (1993); Sorbi, S. et al., *Ann. Neurol.* 38:124-127 (1995); Isoe, K. et al., *Acta Neurol. Scand.* 94: 326-328 (1996)。このため、本発明の方法は、アルツハイマー病に対する疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査に好適に用いられる。本発明の方法は、孤発性アルツハイマー病および家族性アルツハイマー病の両方に適用することが可能である。

またアルツハイマー病以外の脳神経系疾患としては、上記と重複するが、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患などの抑制遺伝子または抑制ポリペプチドをスクリーニングまたは検査することも可能である(T. Kirino, 1982, *Brain Res.*, 239: 57-69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病 (M.H. Polymeropoulos et al., 1997, *Science*, 276: 2045-2047)、びまん性レーピー小体(Lewy bodies)病 (M.G. Spillantini et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6469-6473)、前頭葉痴呆(frontal dementia)等の他の神経変性疾患(Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205:61-64 (1996)) や、血管性痴呆、虚血性脳血管障害に伴う痴呆、ある種のアルコール性痴呆 (Muramatsu, T. et al., *J. Neural. Transm.* 104:913-920 (1997))等の非AD型の痴呆(Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205:61-64 (1996); Ji, Y. et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9:243-245 (1998))、ダウン症に伴う痴呆や加齢に関係した記憶力の低下 (Blesa, R. et al., *Ann. Neurol.* 39:548-551 (1996)) などに対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査も、本発明の方法を用いて行うことができる。

細胞死を伴う疾患の患部またはその周辺では、疾患に対して感受性の高い組織や細胞は細胞死により脱落するため、疾患に対してより抵抗力の高い細胞が残される。このような疾患生物の患部またはその周辺の組織から試料を採取すれば、該疾患に対する抑制遺伝子または抑制ポリペプチドを高い効率で単離することができる。 「患部またはその周辺」とは、疾患に関連する変化または疾患症

状を示す部位または周囲を言い、正常な細胞が含まれていてよい。例えば、疾患部位がある器官内に存在する場合、その器官全体は患部の周辺と言うことができるであろう。脳疾患において、例えば前頭部に細胞変性が見られる場合、例えば後頭部を含む脳全体は「患部またはその周辺」に含まれる。

患部またはその周辺の組織を採取する対象となる臓器は特に制限されず、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織（例えば、神経疾患であれば、神経系、肺疾患であれば、肺組織など）を採取すればよい。この組織や細胞からcDNAライブラリーを作製すれば、そのライブラリーは病態組織の中で生き残った細胞で発現しているmRNAを濃縮するライブラリーとなる。また、この組織や細胞から、公知の蛋白質分離方法に従いポリペプチドを抽出することができる。

患部またはその周辺において疾患症状に差が見られる場合、試料はなるべく患部に近く、かつ疾患症状が軽度の組織または細胞から調製することが好ましい。また、患部とは無関係に、病変臓器に存在する正常、若しくは正常に近い部分から組織または細胞を採取して試料を調製することも好ましい。このような細胞は、疾患抑制遺伝子の発現レベルが他の細胞に比べ高い可能性があり、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングを高い効率で行うことが期待できる。疾患症状が軽度とは、疾患に罹患した生物の中で、最も症状が重篤な部位と比べ、症状の程度が軽いことを指す。疾患に関連して複数の症状を呈する場合においては、少なくとも、そのいずれかの症状に関して比較される。例えば、疾患の病態としての細胞死が起きている臓器、あるいは組織の中で、効率的に細胞が生存する部位からRNAを抽出する。例えば、脳前頭皮質に重篤な症状が観察され、後頭皮質や小脳の症状が比較的軽い場合、後頭皮質または小脳から核酸試料を調製することができる。例えば、実施例においては、アルツハイマー病の抑制遺伝子をスクリーニングするために、ADにおける神経細胞死の主座である大脳の中でほとんど神経細胞が障害を受けない後頭葉からcDNAライブラリーが構築された。他の疾患においても、同様に疾患患部またはその周辺の細胞からRNAを抽出し

、cDNAライブラリーを構築することができる。

組織または細胞からの核酸またはポリペプチドの調製は、公知の方法に従って行うことができる (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)。本発明において「生物の細胞に由来するポリペプチド」には、細胞溶解物または抽出物、その分画物、粗精製または精製ポリペプチドなどが含まれる。細胞抽出物は、適当な分画法により適宜分画されていてよい。このような方法には、例えば硫安沈殿、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltration、アフィニティーコロマトグラフィー、HPLC等の公知の蛋白質分画法または精製法が挙げられる。ポリペプチドは遊離していてもよく、また担体に結合していてもよい。なお、本発明においてポリペプチドとは2またはそれ以上のアミノ酸が結合したペプチドまたは蛋白質を指す。ポリペプチドは、通常、ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーなどと呼ばれるような短い鎖も含まれる。また、ポリペプチドは比較的短い鎖に限定されず、蛋白質と呼ばれるような長い鎖のものも含まれる。例えば300アミノ酸以上、500アミノ酸以上、あるいは1000アミノ酸以上の鎖長からなるポリペプチドであってもよい。すなわちポリペプチドは蛋白質を含む。

また、本発明において「生物の細胞に由来する核酸」には、生物から得た核酸および該核酸から合成した核酸、それらを含む核酸、およびその増幅産物が含まれる。核酸には、DNAおよびRNAが含まれる。例えば、生物から調製したDNA (例えば染色体DNAまたはオルガネラDNAなど)、その転写産物、生物から調製したRNA、該RNAから合成したcDNA、およびそれらの断片などが含まれる。また、生物に由来する核酸には、これらの核酸を含むベクター、該ベクターの増幅産物が含まれる。好ましくは、細胞から調製したmRNAを逆転写してcDNAを合成し、これを発現ベクターに挿入した発現cDNAライブラリーが構築される。RNAの逆転写によるcDNAの合成、およびcDNAからの発現ライブラリーの作製は、公知の方法に従って行うことができる (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., Cold Spring Harbor

Lab. press, 1989)。発現ライブラリーの構築に用いられるベクターとしては、例えばプラスミドベクター（例えば pcDNA および pEF-BOS など）およびウイルスベクター等が挙げられる。

このように調製した核酸またはポリペプチドを検索して、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニングを行う。核酸を検索するとは、核酸または該核酸を含む画分から、候補となる核酸またはそれを含む分画を同定または選別することを指す。また、ポリペプチドを検索するとは、ポリペプチド、または該ポリペプチドを含む画分から、候補となるポリペプチドまたはそれを含む分画を同定または選別することを指す。また、本発明によれば、これらの核酸またはポリペプチドを利用して、疾患に対する抑制効果を検査することも可能である。

組織からRNAを抽出する場合、RNAの分解を抑えるためにはできるだけ迅速に試料を回収し、核酸の調製を行う必要がある。本発明の方法は、疾患生物の患部またはその周辺の細胞から核酸の調製を行えば良く、組織染色や細胞選別などにより組織から特定の細胞を分離することは必須ではない。従って、疾患生物から即座に適切な組織を回収することが可能であり、核酸の分解を最小限に抑えることができる。

本発明のスクリーニングまたは検査方法に適用するために用いる核酸またはポリペプチドは、溶媒や溶質と組み合わせて組成物とすることができる。例えば、滅菌水、緩衝液、生理食塩水、培地、血清、またはそれらを組み合わせた溶媒に、適宜溶解され得る。溶液には、塩や蛋白質、界面活性剤、保存剤等を溶解させることができる。また、核酸を細胞内の導入する場合には、LipofectAMINE (GIBCO BRL 社) 等の各種トランスフェクション試薬と組み合わせることができる。

本発明のスクリーニングは、細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを用いることを特徴とする。患部またはその周辺の細胞で発現するRNAを調製することによって、疾患抑制遺伝子が濃縮されたライブラリーを構築することが期待できる。また同様に、患部また

はその周辺の細胞で発現するポリペプチドを調製することによって、疾患抑制ポリペプチドが濃縮されたライブラリーを構築することができる。このようにして構築されたライブラリーは、疾患抑制遺伝子またはポリペプチドを検索するための機能的スクリーニングやその他の様々なスクリーニングに適用され得る。例えば、疾患原因遺伝子や蛋白質が知られている場合に、この発現や活性を正常に近づけるように作用する疾患抑制遺伝子またはポリペプチドを上記のライブラリーを用いて検索することが考えられる。例えば疾患原因蛋白質の生化学的機能の制御により治療効果が期待できる場合においては、本発明の方法を用いて、この生化学的機能を指標に疾患抑制遺伝子またはポリペプチドが濃縮されていると考えられるライブラリーの検索を行うことは有効である。これらのスクリーニングは、疾患の病態解析や疾患原因遺伝子の機能解析で用いられる公知の系を利用して行うことができる。罹患患部またはその周辺から調製した核酸は、適宜発現ベクター中に組み込み、細胞に導入してその作用が検出される。

また、本発明のスクリーニングは、例えば被検核酸または被検ポリペプチドの疾患に対する抑制効果を検出することにより実施することができる。このスクリーニングは、疾患原因遺伝子の生化学的活性などに注目するのではなく、疾患に対する抑制効果を指標に抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドをスクリーニングする方法である。このスクリーニング方法の1つは、

- (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、
- (b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、
- (c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む。

また、

- (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞

に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、

(c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングを行うこともできる。

また、これと類似の工程により、被検ポリペプチド、被検核酸、または該核酸がコードするポリペプチドの疾患に対する抑制効果を検査することが可能である。

この検査方法の1つは、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む。

また、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法により検査を行うこともできる。このような方法により、例えばスクリーニングにより単離された核酸やポリペプチドをアッセイすることもできる。

疾患に対する抑制効果は、対象とする疾患の症状のいずれかを測定し、被検核酸の発現や被検ポリペプチドの投与により、この症状が抑制されるかを調べることにより行うことができる。疾患の症状は巨視的なものであっても微視的なものであってもよい。例えば微視的な症状として、疾患に関連して起こる細胞の表現形の変化や、疾患に伴う遺伝子（群）の発現レベルの変化などを指標とすることもできる。

上記のスクリーニングまたは検査で核酸を発現、またはポリペプチドを投与する宿主細胞としては特に制限はないが、例えば哺乳動物細胞を用いることができる。哺乳動物細胞としては特に制限はなく、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの非ヒト哺乳動物細胞、およびヒト細胞を用いることができる。一般的な哺乳動物細胞株としては、CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞、HEK293細胞などが挙げられる。また、対象とする疾患の患部組織と同じ組織に由来する細胞株を用いることができる。脳神経系疾患の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドのスクリーニングまたは検査には、好ましくは神経細胞が用いられる。神経細胞としては、例えば、神経系細胞、神経系細胞に由来する細胞および神経前駆細胞等が含まれる。また、神経芽細胞腫、褐色細胞腫、奇形腫、神経系細胞を用いた融合細胞および胎児性胚細胞等が含まれる。本発明の方法に用いられ得る神経細胞株としては、F11細胞(D.Platika ら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3499, T.Yamatsuji ら, 1996, Science, 272:1349)、SH-SY5Y細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)、PC12細胞(L.A. GreeneおよびA.S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. SkowronskiおよびM. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054)、P19細胞、ならびにこれらに由来する細胞などが挙げられる。NTERA2細胞およびP19細胞においては、特に、レチノイン酸処理により神経分化を誘導したものが好ましい。F11細胞に由来する細胞としては、F11/EcR細胞(Y. Hashimoto et al., J. Biol. Chem. published on-line on August 3, 2000)、F11/EcR/V642I細胞(T. Niikura et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 442-447) (いずれも実施例参照) を挙げることができる。また、初代神経培養 (例えばラット脳皮質初代培養) を用いることもできる。細胞での核酸の発現は、核酸を発現ベクターに組み込み、細胞に導入することにより行うことができる。またポリペプチドの投与は、培地に添加したり、細胞内に注入することにより行うことができる。また、細胞は個体内の細胞であってもよい。個体で核酸を発現させるには、発現ベクターを個体に投与すればよい。

発現ベクターとしては、例えばウイルスベクターが用いられる。ウイルスベクターとしは、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターなどの公知のベクター系が利用できる。ポリペプチドの投与は、組織または細胞への直接投与の他、静脈投与、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与などの公知の投与経路により行うことができる。スクリーニングまたは検査に用いられる生物としては、マウス、ラット、ウサギ、サルなどの非ヒト哺乳動物が挙げられる。具体的には、*in vivo* または *in vitro* で構築される様々な疾患モデルを本発明の方法に適用することができる。このような疾患モデルは数多く知られている。

検出の結果、被検核酸の発現またはポリペプチドの投与が、疾患の発症、症状、および／または進行等に対して抑制的または正常に近づけるように作用する場合、疾患に対する抑制効果を有すると判定される。このように疾患に対する有意な抑制効果が認められる核酸またはポリペプチドは、それぞれ疾患に対し抑制効果を有する遺伝子またはポリペプチドと判定される。また検査においては、定量的な測定など、抑制効果のより詳細な測定を行うこともできる。

被検核酸またはポリペプチドの効果は直接的または間接的であり得る。例えば、核酸またはその発現産物自体 (RNAまたはポリペプチド) が効果を有する場合や、核酸またはその発現産物が別の因子に作用することによって効果を発揮する場合を考えられる。上記のスクリーニング方法または検査方法により単離または選別され得るこれらの核酸は疾患抑制遺伝子となる。また、上記のスクリーニング方法または検査方法により単離または選別され得るポリペプチドは疾患抑制ポリペプチドとなる。単離されたポリペプチドは、例えば部分アミノ酸配列を解析し、これを基に作製したDNAプローブやプライマーによりゲノムDNAやcDNAをスクリーニングすることで、該ポリペプチドをコードする核酸 (疾患抑制遺伝子) を取得することができる。

疾患に対する抑制効果を、細胞死により判別するスクリーニング系または検査系を構築することもできる。このスクリーニング方法または検査方法は、疾患の

病態の一部である細胞死そのものを指標とする方法である。このスクリーニングまたは検査方法は、上記工程 (a) あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程 (b) において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する方法である。実施例において、本発明者はアルツハイマー病に関連する細胞死を誘導できる細胞系を利用して、該細胞死を抑制する遺伝子のスクリーニングを行った。この方法では、家族性アルツハイマー型変異APPを神経細胞で発現させ、誘導される細胞死を抑制する遺伝子がスクリーニングされる。神経細胞死の誘導は、実施例で用いられた V642I APPの発現に限定されず、細胞死を誘導する所望の処理により実施することができる（国際公開番号 WO00/14204 および 国際出願番号 PCT/JP00/02830 参照）。また、スクリーニングにより単離されたポリペプチド、遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチド、およびそれらの誘導体などは、例えば実施例に記載したように、各種のFAD遺伝子やA $\beta$ で誘導される神経細胞死に対する抑制効果について詳細な検査を行うことができる。

具体的な方法を例示すれば、例えば V642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、または N141I PS-2などのFAD遺伝子を発現するベクターを単独で、または検定したい核酸を発現するベクターと共に神経細胞（例えばF11細胞）にトランスフェクトする。あるいは、初代神経培養（例えばラット脳皮質初代培養）へのA $\beta$ （例えば A $\beta$ 1-43）の添加により細胞死を誘導してもよい。また、APPリガンド（APP抗体を含む）の添加、ApoE4などの ApoER-1リガンドの添加などによって細胞死を誘導することもできる。被検核酸を発現させて培養後、細胞死を測定する。FAD遺伝子は、誘導性プロモーターを用いてコンディショナルに発現させることもできる。検定したい核酸の非発現条件で誘導される細胞死に対して、該核酸を発現させた条件下における細胞死の比率が有意に低下すれば、この核酸は疾患に対して抑制効果を有する遺伝子であると判定される。被検試料としてポリペプチドを用いる場合は、このポリペプチドを含む試料の存在下または非存在下で細胞死を測定する。

検定したいポリペプチドの非存在下で誘導される細胞死に対して、該ポリペプチドの存在下における細胞死の比率が有意に低下すれば、このポリペプチドは疾患に対して抑制効果を有するポリペプチドであると判定される。核酸の作用の検査やスクリーニングにおいては、被検核酸を発現させる代わりに、検定したい核酸がコードし得るポリペプチドを予め調製しておき、このポリペプチドの存在下または非存在下で細胞死を測定してもよい。

細胞死の抑制を指標とするスクリーニングや検出は、アルツハイマー病以外の疾患に対しても同様に適用することができる。疾患に関連する細胞死は、例えば疾患を再現する因子を与えたり、疾患原因遺伝子を発現させたりすることにより誘導し得る。具体的には、例えば、ポリグルタミンを神経細胞に発現して細胞死を誘導する系 (de Cristofaro, T. et al., 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 816-821) を利用することができる。この系は、脊髄小脳変性症やハンチントン病のモデルとして知られ、本発明において、これらの疾患に対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドの検査やスクリーニングに適用され得る。また、SOD1変異体を発現する系 (Silani, V. et al., 2000, *J. Neurol.* 247 Suppl 1: I28-36) も挙げることができる。この系は、筋萎縮性側索硬化症のモデルとして知られており、この疾患の抑制遺伝子や抑制ポリペプチドの検索も本発明の方法の適用対象となる。また、プリオントン部分ペプチド (116-126) を神経細胞に処理する系 (Thellung, S. et al., 2000, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 481-492) はプリオントンによる脳症のモデルとして本発明において利用できる。また、ヒトアミリンを脳細胞に処理する系 (Bai, J.Z. et al., 1999, *Biochem. J.* 343 Pt 1: 53-61) はI型糖尿病のモデルとして利用することができる。さらに、Jurkat細胞などのT細胞に抗Fas抗体を処理する系 (Li, X.K. et al., 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 101-109) は劇症肝炎のモデルとして、同じくT細胞にT細胞受容体抗体を処理する系 (Vito, P. et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 31025-31028) は自己免疫疾患の系として利用され得る。また、ロドプシン変異体を発現する

系 (Liu, C. et al., 1999, *J. Neurosci.* 19: 4778-85) は網膜色素変性症のモデルとして本発明の方法の適用対象となる。これらのモデルにおいて、例えば疾患生物の患部またはその周辺に由来する核酸やポリペプチドを導入し、細胞死の比率を検出することにより本発明の検出またはスクリーニングを行うことができる。核酸またはポリペプチド試料の由来に制限はないが、例えば患者組織に由来するもの、または疾患モデル動物に由来するものなどが挙げられる。また、モデル培養系等に由来するものであってもよい。

実施例において、本発明者は72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 による神経細胞死誘導系を用いて、HNペプチドの効果を検討している（実施例8）。上記のように、ポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病（HD）や、ある種の脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の原因になっていると考えられている (Ikeda, H. et al. (1996) *Nat. Genet.* 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) *Curr. Opin. Neurol.* 10, 285-90)。本発明者は、具体的には、エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経細胞死を誘導し、HN ポリペプチドの抑制効果を検査した。これと同じ系は、ハンチントン病（HD）や、脊髄小脳性運動失調症 (SCA) の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドのスクリーニングや検査に用いることができる。すなわち、罹患患部またはその周辺から調製したmRNAから構築した発現ライブラリーを上記の細胞にトランスフェクトし、細胞死を検出することにより実施することができる。

また、本発明者は、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; 家族性ALS) に関連した Cu/Zn 依存性スーパーオキサイドディスムターゼ (SOD1) の変異体による神経細胞死を誘導する系を用いて HN ペプチドの効果を検討している（実施例8）。この実験では、SOD1の A4T、G85R、または G93A 変異体により細胞死を誘導した。これと同様の系を本発明の方法に適用すれば、ALS の抑制遺伝子または抑制ポリペプチドの検査およびスクリーニングを行うことが

可能である。同様に、その他の疾患モデル系を用いて、本発明のスクリーニングおよび検査を実施することが可能である。

細胞死の検出方法としては、細胞数測定、トリパンブルー排除法などによる生細胞測定、MTTなどを用いた生化学的アッセイ等が挙げられる。またLDH放出を測定してもよい。更に、アポトーシスを検出する方法を用いることもできる。アポトーシス検出法としては、TUNEL法、DNAラダー法、電子顕微鏡を用いた方法、あるいは核や細胞膜の特有の変化を検出する方法が挙げられる。最後者の例としては、アネキシンV測定法や、核の形態変化、またはカスパーゼ活性を測定する方法が挙げられる。

検出の結果、細胞死の比率を有意に低下させる効果が認められれば、スクリーニングまたは検査に用いた被検核酸またはポリペプチドは疾患に対し抑制効果を有する遺伝子またはポリペプチドと判定される。このとき、細胞死を完全には阻害できなくても、被検核酸を発現させない場合または被検ポリペプチド非存在下における場合に比べ、細胞死の比率を有意に低下させるものであればよい。このようにして疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドを単離または選別することができる。

上記に記載した本発明の方法により単離または選別された遺伝子やポリペプチドは、疾患の予防や治療のための利用が期待される。疾患抑制遺伝子はベクターに挿入して增幅や発現を行うことができる。このようなベクターは、遺伝子治療目的に利用することも可能である。遺伝子治療に用いるためのベクター系としては、アデノウイルスベクター、AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクター、ヘルペスウイルスベクター(いずれも Robbins and Ghivizzani, Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998)、レトロウイルスベクター(Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999)、レンチウイルスベクター(Lundstrom, K., 1999, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686)などを用いることが考えられるが、これらに制限はない。また、効果が維持される限り、遺伝子の塩基配列およびポリペプチドのアミノ酸

配列は、欠失、付加、挿入、および/または置換などにより適宜変異を加えることができる。

単離された遺伝子がペプチドをコードする場合は、遺伝子を発現させることによりペプチドを産生させることができる。ポリペプチドの産生のために用いられる宿主に特に制限はなく、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などの細胞または個体を用いることができる。宿主-ベクター系としては、例えば、バキュロウイルス-Sf細胞系 (Okamoto et al., J. Biol. Chem. 270: 4205-4208, 1995)、pcDNA-CHO細胞系 (Takahashi et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995)、および CMVプロモータープラスミド-COS細胞系 (Yamatsuji et al., EMBO J. 15: 498-509, 1996) などが挙げられるが、これらに制限はない。

また、上記の核酸またはポリペプチドは、人工的に合成したり、誘導体とすることが可能である。「誘導体」とは、核酸またはポリペプチドの官能基を修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ分子である。このような改変は既知の方法により行うことができる。官能基の改変は、例えば、核酸またはポリペプチドに存在する官能基の保護、安定性または組織移行性の制御、あるいは疾患を抑制する活性の制御等を目的として行われる。

単離された核酸またはポリペプチド、あるいは該核酸によりコードされるポリペプチドは、疾患を抑制するための試薬とすることができます。核酸は適宜ベクターに組み込み、該ベクターを試薬することができる。核酸またはポリペプチドを含む試薬は、核酸やポリペプチド自体を試薬として用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質 (BSAなど)、トランスフェクション試薬 (リポフェクション試薬を含む) 等と適宜組み合わせてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。

また、上記核酸 (若しくはベクター) またはポリペプチドは、疾患に対する医薬組成物とすることができます。この医薬組成物は、核酸またはポリペプチド自体

を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。核酸やポリペプチドの含有率は適宜決定すればよい。

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうるがそれらに限定されない。脳神経系疾患の治療に用いる場合においては、上記医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列 (-934から600; 1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である) に対して整列させた。V642I APP により誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 $\mu$ g) と共に、1 $\mu$ gの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリパンブルー排除アッセイにより細胞死

を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはアンタゴナイス活性があると判定し、"Y"で示した。"N"は有意なアンタゴナイス活性がなかったことを示す。

図2は、エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63 とD171は pEF-BOS にクローニングされている)をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。DT63とDT171は図1に示されている。

図3は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローンの効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1 、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。

図4は、FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、DT44、および DT171 クローンの効果を示す図である。図3と同様に、F11 細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クローンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行ったところ、ペーサルな細胞死の比率(トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS

) は共通していた。同様の実験は少なくとも 3 回行った。図中のエラーバーのある数値は平均士S.D.を表す。

図 5 は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72 時間培養した。細胞死をトリバンブルー排除アッセイにより測定した。値は 3 回の独立した実験結果の平均士S.D.を表す。

図 6 は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で 3 時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で 2 時間培養した後、CM/F11-pHN (CM/pHN)、CN/F11-vec (CM/vec)、または新鮮な培地 (18%FBSを含む新しい HamF-12) で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリバンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。値は 3 回の独立した実験結果の平均士S.D.を表す。p<0.01 は Student の t 検定による。

図 7 は、pHNをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清に含まれる HN ポリペプチドの免疫反応性を示す写真である。左と中央のパネルは、細胞抽出液 (30  $\mu$ g protein) および培養上清 (20  $\mu$ l) をTris/Tricineゲル電気泳動後、抗FLAG抗体を用いたイムノプロットを行った結果を示す (1 : トランスフェクションなしの細胞； 2 : pFLAGをトランスフェクトした細胞； 3 : pHNをトランスフェクトした細胞)。右のパネルは、pHN、pHNG、またはpHNA をトランスフェクトした細胞の培養上清を同様に解析した結果である。右の 3 レーンは、培養上清中に含まれる HN ポリペプチドのタイマーを決定するために、図示した濃度の sHN-FLAG (MAPRGFSCLLLTSEIDL~~P~~VKRRAGTDYKDDDDK : 下線は FLAGタグ) (配列番号 : 6) のイムノプロットを行った結果を示す。同様の実験は 4 回以上繰り返した。

図8は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、合成HN (sHN) およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11細胞に V642I APPをコードするpcDNAをトランスフェクトし、様々な濃度の sHN (元々の HN) (配列番号: 5)、sHNG (S14G) (配列番号: 7)、sHNA (C8A) (配列番号: 8)、C8を介した sHN のダイマー型 (C8-C8)、および C末の KRRA を AAAA に置換した sHN (KRRA21/22/23/24AAAA) (配列番号: 9) で処理した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図9は、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP により誘導される神経細胞死における sHN、sHNG、または sHNAの効果を示す図である。図8と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNAをトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の HN)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図10は、ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死における HNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現プラスミドと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNAをトランスフェクトし、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションによる有意な抑制効果。A と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、

エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

D: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHNの有意な抑制効果。C と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  のsHNで処理した後、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図 1 1 は、ALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均士S.D.を示す。

A: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのトランスフェクションの効果の欠如。F11 細胞に、ALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T 、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSを、空ベクター (pFLAG)、または pHN と共にトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG 、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、 $100\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図12は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す位相差顕微鏡像を示す写真である。代表的な観察像を示した。初代培養皮質神経を、sHN (10nM, 10 $\mu$ M)、10nM sHNG、または 10 $\mu$ M shNA の存在下または非存在下で 25 $\mu$ M の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。 $A\beta$ 1-43処理の開始16時間前に、図示した最終濃度のHNポリペプチドを1回添加した。 $A\beta$ 1-43の添加は、まず培地の半分を除去し、上記と同じ濃度のsHNまたはshNAと50 $\mu$ Mの $A\beta$ 1-43とを含む新鮮な培地を除去した培地と等量補充することによって行った。 $A\beta$ 処理しない未処理の細胞 (no treatment) も観察した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。

図13は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または shNA の存在下または非存在下で 25 $\mu$ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。 $A\beta$ 処理の開始から72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験の際、ポジティブコントロールとして、初代培養神経を 10 $\mu$ M sHN または HN誘導体の存在下または非存在下、20 $\mu$ Mのエトポサイドで72時間同様に処理した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図14は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。培養液中に放出されたLDH量により細胞傷害性をモニターした。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または shNA の存在下または非存在下で 25 $\mu$ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。 $A\beta$ 処理開始の24、48、または72時間後に培養液中のLDH量を測定した。HNポリペプチドの存在下または非存在下で20 $\mu$ Mのエトポサイドで処理した神経からのLDH放出も測定した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図15は、 $A\beta$ 1-43により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効

果を示す写真である。Calcein-AM染色の結果を蛍光顕微鏡像で示す。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で  $25\mu\text{M}$  のA $\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。A $\beta$ 1-43処理の72時間後に Calcein-AMで染色を行った。A $\beta$ 処理しない未処理の細胞 (no treatment) も観察した。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は代表的な結果を示す。

図16は、Calcein-AM染色の蛍光測定の結果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で  $25\mu\text{M}$  のA $\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図12と同様に行った。A $\beta$ 1-43処理の72時間後に Calcein-AMで染色を行い、蛍光強度を測定した。基底状態の蛍光強度は 36960 (unit/well) と計算され、これを各値から差し引いた。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均士S.D.を示す。

図17は、ヒトの様々な組織中のHN mRNAの発現を示す写真である。ヒト組織のポリA-RNAがプロットされたシートに放射標識したアンチセンスHN (a)、5'領域をコードする19mer (b)、またはDT77 (c) をプローブとしてハイブリダイズさせた (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:大腸、5:胸腺、6:脾臓、7:腎臓、8:肝臓、9:小腸、10:膵臓、11:肺、12:末梢血白血球)。(d) は同じシートを、 $\beta$ -actinをプローブにしてノーザンプロットを行った結果を示す。左側の数字は分子量サイズを示す。同様の実験は少なくとも3回行い、これと同様の結果を得た。

図18は、マウス組織でのHN mRNAの発現を示す写真である。マウスの様々な器官から抽出したポリA-RNA ( $2\mu\text{g}$ /レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、プロット後、標識したアンチセンスHN (左上) または $\beta$ -actin (左下) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:胸腺、5:脾臓、6:腎臓、7:肝臓、8:小腸、9:胃、10:皮膚、11:肺)。

右のパネルはマウス脳におけるHN mRNAの発現領域を示す図である。マウス脳の様々な領域由来のポリA-RNAがプロットされたシート（1:前頭葉、2:側頭葉、3:頭頂葉、4:後頭葉、5:小脳、6:肺）に、標識したアンチセンスHN（右上）または $\beta$ -actin（右下）プローブをハイブリダイズさせた。シート間で量的な比較ができるように、左パネルと同じ量の肺由来のポリA-RNAをレーン6に泳動してハイブリダイゼーションを行った。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。本実施例に記載された実験方法を以下に示す。

V642I APP cDNA は以前記載されている (Yamatsuji, T. et al. (1996) *Science* 272, 1349-1352)。PS-1 cDNA の M146L 変異体および PS-2 cDNA の N141I 変異体は、それぞれ Peter St. George-Hyslop博士 (Sherrington, R. et al. (1995) *Nature* 375, 754-760)、および Luciano D'Admio博士 (Wolozin, B. et al. (1996) *Science* 274, 1710-1713) より寄贈された。本実施例で用いた全てのFAD遺伝子は pcDNA ベクター (Funk, C.D. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5638-5642) にコードされている。SOD1 cDNA の ALS関連変異体 (A4T, G85R, G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) *Acta Neuropathol.* 88, 185-8)、および pDN-E/G5H-Q79 は、それぞれ Shoji Tsuji博士 (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)、および Akira Kakizuka博士 (Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan) より寄贈された。

Humanin をコードするプラスミド pHN は、HN cDNA を pFLAG-CMV-5aベクター (pFLAG) (Eastman Kodak) のポリクローニングサイトに挿入して構築した。すなわち、pFLAG-CMV-5aプラスミドを EcoRI および KpnI で切断し、HNをコードするセンスオリゴヌクレオチド (5'-AATTCAACCATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTTACTTTT

AACCACTGAAATTGACCTGCCGTGAAGAGGCAGGCAGGTAC-3' /配列番号:1)とアンチオリゴヌクレオチド(5'-CTGCCCCCTTCACGGGCAGGTCAATTCACTGGTTAAAAGTAAGAGACAGCTGAACCCCTCGTGGAGCCATGGTG-3' /配列番号:2)をライゲーションした。このプラスミドは、FLAGタグ(DYKDDDDK)がC末端に融合したHumaninポリペプチドを発現する。

変異HNをコードする pFLAGプラスミド(pHN<sub>G</sub>およびpHN<sub>A</sub>)は、pHNからQuick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて構築した。配列は、直接塩基配列決定法により確認した。合成HNポリペプチド(sHN)および構造改変した合成ポリペプチドは95%以上に精製したものを用いた。

合成HN(sHN)および他の幾つかの合成HN誘導ポリペプチドは2箇所の入手経路から独立して入手したが、どちらも本質的に同じ結果が得られた。抗FLAG抗体はEastman Kodak (M2モノクローナル抗体, Cat. #IB13010)から購入した。A $\beta$ 1-43はBACHEM (Cat. #H-1586)より購入した。他の試薬は全て商業的に入手可能なものを用いた。

F11細胞(Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503; Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)は、18%ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質を含むHamF-12培地で培養した。6ウェルプレート上に $7 \times 10^4$  /ウェルのF11細胞を播き、18%FBSを含むHamF-12培地で12~16時間培養した後、FAD遺伝子をコードするプラスミドを、HNをコードするプラスミド(pHN等)と共に、リポフェクションにより血清の非存在下3時間トランスフェクトし(FAD cDNA発現プラスミド1 $\mu$ g、HN cDNA発現プラスミド1 $\mu$ g、LipofectAMINE 4 $\mu$ l、Plus試薬8 $\mu$ l)、18%FBSを含むHamF-12培地で2時間培養した。その後培地を10%FBSを含むHamF-12培地に交換し、さらに67時間培養した。トランスフェクションから72時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。合成HNポリペプチドを用いた実験では、F11細胞(6ウェルプレート上で $7 \times 10^4$  /ウェル)に血清非存在下で上記と同様にFAD遺伝子を3時

間トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した後、様々な濃度の HN ポリペプチドと共に 10% FBSを含む HamF-12 培地で 67時間培養し、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。SOD1のALS関連変異体 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

pHNをトランスフェクトした F11細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) を得るために、F11細胞に pHN をリポフェクションにて血清非存在下で 3 時間トランスフェクトし (pHN 1 $\mu$ g、LipofectAMINE 2 $\mu$ l、Plus試薬 4 $\mu$ l)、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。この培養培地を 1 回凍結融解して CM/F11-pHN とした。CM/F11-vecは、pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞から同様にして調製した。CM/F11-pHN、CM/F11-pHNG、および CM/F11-pHNA のイムノプロット解析では、凍結融解しない培養培地にプロテアーゼインヒビターカクテル (Boehringer Mannheim, Cat. #1697498; 2mlの蒸留水に1錠を溶かし、試料の 1/25 容を添加した) を加えた。細胞のライセートを用いたイムノプロット解析では、細胞をPBS で2回洗浄し、30 $\mu$ lのホモジエナイジングバッファー [10mM Tris/HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, および 1錠/50mlのプロテアーゼインヒビターカクテル] 中に懸濁した。2 回凍結融解した後、細胞のホモジエネートを4°Cで 15,000rpmで10分遠心し、上清をTris/Tricineゲル電気泳動してイムノプロット解析に供した。Tris/Tricineゲル電気泳動は、以前記載されたように行った (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) *Analytical Biochemistry* 166, 168-179)。

F11/EcR/V642I 細胞は、エクダイソン誘導型 V642I APP 発現プラスミドを用いて樹立した。まず、共発現ベクター pVgRXR (Invitrogen) を F11細胞に導入し、それに続くZeocin選択により、エクダイソン受容体 EcR とレチノイドX受容体 RXR の両方を安定に過剰発現する F11細胞 (F11/EcR細胞) を樹立した。多コピーのエクダイソン応答配列を有する pIND ベクター (Invitrogen) に V642I APP cDNA

を挿入し、F11/EcR細胞にトランスフェクトした後、G418選択を行った。限界希釈により、F11/EcR/V642I 細胞をクローニングした。F11/EcR/V642I 細胞は、18% FBS と抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。エクダイソル処理の前に、細胞を 10% FBS 存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS 存在下で細胞培養液にエクダイソル (40  $\mu$ M Ponasterone; Invitrogen Cat. #H101-01) を添加した。エクダイソル処理に応答して、各 F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が起り、全細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で 80~90% に達した。F11/EcR/V642I 細胞の更に詳細な解析は、別途記載されている（国際公開番号 WO00/14204 参照）。

エクダイソルを用いた F11/EcR 細胞の実験では、F11/EcR 細胞を 6 ウェルプレートに  $7 \times 10^4$  /ウェルで播き、18% FBS を含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、エクダイソル誘導型プラスミド 1  $\mu$ g を単独で、または HN をコードするプラスミド 1  $\mu$ g と共に、血清非存在下で上記と同様に 3 時間トランスフェクトした。18% FBS を含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、細胞を 10% FBS を含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、エクダイソル (Ponasterone) を培地に添加した（終濃度 40  $\mu$ M）。エクダイソルで処理後 72 時間での細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、細胞に FAD 遺伝子を血清非存在下で 3 時間同様にトランスフェクトし、18% FBS を含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、様々な濃度の HN ポリペプチドと 10% FBS を含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、40  $\mu$ M の Ponasterone を培地に添加した。エクダイソルで処理後 72 時間での細胞死を、トリパンブルー排除アッセイにより測定した。HD/SCA 関連 Q79 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

マウス皮質神経の初代培養は、ポリ-D-リジンコートした 24 ウェルプレート (Sumitomo Bakelite) を用い、血清非存在下および N2 サブリメントの存在下で、以前記載されたように行った (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90)。この方法により調製した神経の純度は >98% であった。調製した神経 (

1.25×10<sup>5</sup>/ウェル、250μl培地/ウェル)は、10nMまたは10μMのsHNポリペプチド存在下または非存在下で16時間ブレインキュベートを行い、同じ濃度のsHNポリペプチドの存在下または非存在下で、25μMのAβ1-43で24~72時間処理を行った。初代培養神経は、培地交換に伴う一過的な乾燥でも傷害を受けるため、Aβ1-43による細胞の処理は次のように行った。まず、古い培地の半量(125μl)を捨てた。そして、50μMのAβ1-43と先に示した濃度のsHNを含む予め温めておいた新鮮な培地125μlを培養に加えた。

トリパンブルー排除アッセイは、次のようにして行った。プレウォッシュなしで細胞を血清不含の培地に穏やかにピベッティングして懸濁した。200μlの細胞懸濁液に50μlの0.4%トリパンブルー溶液(Sigma, Cat. #T-8154)を加え(終濃度0.08%)、室温で混合した。トリパンブルー溶液を加えてから3分以内に、染色された細胞を計数した。これを基に細胞死の比率を決定した[100-細胞生存率(%)]。LDHアッセイは、神経を培養した培地6μlをサンプリングして、キット(LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601)を用いて行った。カルセイン染色は、以前記載されたようにして行った(Bozyczko-Coyne, D. et al. (1993) Journal of Neuroscience Methods 50, 205-216)。簡単には、6μMのCalcein-AM{3',6'-Di-(0-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201}を神経に添加し、Calcein-AM処理後30分以上経過してから蛍光(ex=490nm, em=515nm)を蛍光顕微鏡により観察し、スペクトロメーターにより測定した。特異的な蛍光は、全蛍光から基底状態の蛍光を差し引いて計算した。基底状態の蛍光は、トリパンブルー陽性度-蛍光強度の直線関係から算出される、100%トリパンブルー陽性に対応する値とした。

アッセイは少なくとも3回、独立してトランスフェクションまたは処理を繰り返して行った。統計解析ではStudentのt検定を行った。

ノーザンプロット解析のためのオリゴヌクレオチドの放射標識は、Renaissance

3' end labeling system (NEN) を用いてターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により行った。すなわち、75pmolのプローブオリゴヌクレオチド、100pmolの 3'-[<sup>32</sup>P]-dATP (185TBq/mmol, NEN)、および 36 unit のTdT を37°Cで30分インキュベートした後、標識されたオリゴヌクレオチドをゲルfiltrationにより分離した。この操作により、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ l の標識プローブが得られた。プローブに用いたアンチセンスHNは 5'-CTG CCC GCC TCT TCA CGG GCA GGT CAA TTT CAC TGG TTA AAA GTA AGA GAC AGC TGA ACC CTC GTG GAG CCA TGT GGT G-3' (配列番号: 3) である。cDNA断片は Ready-To-Go random labeling system (Amasham Pharmacia) により放射標識した。すなわち、50~500ng の変性させたDNA断片および 1.85MBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP を37°Cで30分インキュベートした後、標識されたDNA断片をゲルfiltrationにより分離した。この操作により、約 $5 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g DNA の標識プローブが得られた。ノーザンプロット解析は ExpressHyb (Clontech) を用いて行った。すなわち、プレハイブリダイゼーションの後、組織のポリA<sup>+</sup>-RNAがプロットされた膜 (ヒト組織の膜は Clontech より、マウス組織の膜は Origene より入手) を放射標識されたプローブ ( $2 \sim 5 \times 10^7$  cpm) に18時間浸漬させた。説明書に従って2ステップの洗浄を行った後、増感スクリーンを2枚使って膜をX線フィルムに-70°Cで露光させた。

#### [実施例 1] 発現cDNAライブラリーの構築

研究所のガイドラインに従って、生検により孤発性アルツハイマー病であることが確認された患者の脳試料 (後頭皮質) からポリA<sup>+</sup> RNAを抽出し、発現ベクターに組み込み発現cDNAライブラリーを構築した。発現ベクターには、エロンゲーションファクタープロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター pEF-BOS (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) を用いた。ポリA<sup>+</sup> RNAは、NotI部位を含む改変オリゴdTプライマーを用いて逆転写した。二本鎖cDNAにEcoRI-BstXIアダプタープライマー (5'-pGAA TTC ACC ACA-3' および 3'-CTT AAG GTGp-5') をライゲートし、NotIで切断した。低分子DNAを除いた後、cDNAは pEF-BOS

の *Bst*XI-*Not*I 断片にライゲートし、エレクトロポレーションにより XL1 Blue MRF' 株へ形質転換した。初代ライプラリーサイズおよび挿入断片の平均サイズはそれぞれ  $3.2 \times 10^6$  cfu/16ml および 0.9kb であった。

#### [実施例 2] Humaninの同定

F11細胞は、E17.5のラット初代培養神経とマウス神経芽細胞腫 NTG18 を細胞融合させて樹立された、初代培養神経の不死化細胞モデルである(Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。分化刺激がなければ、この細胞は活動電位の生成などの初代培養神経に典型的な特徴を保持している (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。本発明者は、3種の FAD原因遺伝子である V642I/F/G APP をコードする cDNA を F11細胞にトランスフェクトすることにより、APPの V642 変異体の一過的な発現が細胞死を引き起こすことを見出した(Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。そこで本発明者は、最近開発されたエクダイソン誘導系 (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) を用いて、V642I APP を誘導できるF11クローンの構築を行った。まず、エクダイソン受容体と RXR の両者を過剰発現する F11クローン (F11/EcR) を樹立し、この細胞に、エクダイソン応答配列の制御下に置かれた HSV プロモーターにより発現される V642I APP cDNA をコードする pIND-V642I APP を安定にトランスフェクションすることにより、V642I APPの発現を誘導することができる F11細胞を樹立した。このようにして樹立されたクローン F11/EcR/V642I 細胞は、そのままでは V642I APP をほとんど発現しないが、エクダイソン処理によりコンディショナルに V642I APP を過剰発現することが確かめられた。そしてエクダイソン処理に応答して、各 F11/EcR/V642I細胞で細胞死が誘導され、全F11/EcR/V642I細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で 80~90%に達した。

これらの細胞を用いて、D' Adamio ら (D' Adamio, L. et al. (1997) Semin. Immunol. 9, 17-23) により開発された方法に基本的に従いながら、それに修正を

加えた「デストラップスクリーニング」を行った。最初に記載された「デストラップスクリーニング」においては、Vitoらは正常T細胞 cDNAライブラリーを Jurkat細胞にトランスフェクトし、T細胞受容体の刺激により細胞死を誘導し、細胞死をアンタゴナイズする遺伝子を回収した。本発明者は、デストラップスクリーニングを行い、AD遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズする遺伝子のスクリーニングを試みた。上記で作製したアルツハイマー病患者の脳試料から調製したcDNAを持つcDNA発現ライブラリーを F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクトし、この細胞をエクダイソンで 72 時間処理して生き残った細胞からプラスミドを回収した。この操作を 3 回繰り返し、最終的に約250クローンのプラスミドを得た。各プラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより、これらのクローンは互いにクロスハイブリダイズする 36 のグループに分類された。最も大きいグループは 28 のクローンからなっていた。

このグループの cDNA に着目し、各クローンのシークエンスを行った結果、このグループに属するクローンは総合すると、5' 配列は Wnt-13 の非コード領域と相同性があり、3' 配列は ミトコンドリア 16S リボソーム RNA と相同性があり、C末端にポリA領域を持つ1535bpの融合配列からなるcDNAをコードしていた。この配列全体は新規なものであった(図1)。各クローンの配列を決定したのち、各クローンの一過的なトランスフェクションが、pIND-V642I APP をコトランスフェクトした F11/EcR 細胞のエクダイソンにより誘導される細胞死を有意に抑制するかについてアッセイを行った。細胞死抑制活性を示した各々の配列を比較した結果、V642I APPにより誘導される細胞死をアンタゴナイズする活性は、新規な24アミノ酸のポリペプチド「MAPRGFSCLLLTSEIDLGVKRRA」(配列番号: 5) をコードする 75bp のオープンリーディングフレーム (ORF) (5'-ATGGCTCCACGAGGGTTCAGC TGTCTCTTACTTTAACCAAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGGGCGGGCATGA-3' / 配列番号: 4) によりコードされていることが判明した。本発明者は、この分子を Humanin (HN) と名付けた。

〔実施例 3〕 FAD遺伝子により誘導される細胞死における各クローンの抑制効果

図2～4は、このグループに属する各クローンをコトランスフェクトしたときの効果を示す。F11/EcR細胞 (EcRとRXRとを安定に発現する F11 クローンで、エクダイソンにより pINDプラスミドによりコードされる遺伝子の発現が誘導される) にV642I APP をコードする pIND を一過的にトランスフェクトしたところ、エクダイソンの非存在下 (V642I APP 非誘導条件) では、72時間後に約 20%の細胞が細胞死を起こしたのに対し、エクダイソンの存在下 (V642I APP 誘導条件) では、有意に高い割合 (50～60%) の細胞が細胞死を起こした(図2)。F11/EcR細胞に、V642I APP をコードするpINDに加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトすると、エクダイソン存在下でも、エクダイソンにより誘導される細胞死の有意な増加は観察されなかった。これとは対照的に、pEF-BOS、または DT171 をコードする pEF-BOS を細胞にトランスフェクトした場合には、エクダイソンに応答した細胞死の有意な増加が観察された。図3は、単純な一過的トランスフェクションを用いて4つの各FAD遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、および N141I PS-2) により誘導される神経細胞死における DT63 の効果を確認した結果である。各FAD遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 cDNA) をコードする pcDNA のいずれかに加え、空のpEF-BOS を F11 細胞にコトランスフェクションした場合、72時間のインキュベーションにより 50～70%の細胞が細胞死を起こした。この条件におけるトランスフェクションの効率は約60～70%であるため、各FAD遺伝子を発現する細胞の大部分が、トランスフェクト後 72 時間で細胞死を起こしたことになる。F11細胞に、各FAD遺伝子に加え、DT63をコードする pEF-BOS をトランスフェクトした場合、細胞死の増加は劇的に抑えられた。このことは、DT63 cDNA が4つのAD遺伝子により誘導される細胞死すべてを、高い効率でアンタゴナイズすることを示している。図4は、HN の全配列を含む他の DTクローンや全配列を含まない他のDTクローン (DT29、DT44、および DT171

cDNA) の効果を示す。HN の全配列をコードするクローンである DT29 および DT44 では、各FAD遺伝子により誘導される細胞死の顕著な抑制が認められたが、HN の第一ATGコドンを持たない DT171 では、細胞死をアンタゴナイズする作用は認められなかった。これらのデータは、HN がコードする ORF が、4つのすべてのFAD 遺伝子による細胞死から神経細胞を保護することを示している。

そこで本発明者は、HN cDNAを pFLAG ベクターへサブクローニング (pHN) し、V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2の各々のFAD遺伝子による神経細胞死に対する pHN の効果を直接調べた。予想された通り、F11細胞に対する pHN のトランスフェクションは、毒性をほとんど示さないばかりか、各FAD遺伝子による毒性を解消させた (図 5)。このアンタゴナイズ活性は、pHN により各FAD 遺伝子の発現が抑制されることによるものではない。なぜなら、pHN のコトランスフェクションは、CMVプロモーターにより発現する EGFP の発現を変化させなかつことから (データ省略)、コトランスフェクトされた pHN は、同じ CMV プロモーターから発現される各FAD遺伝子の発現を変化させないことが示されたからである。さらに、V642I APP、NL-APP、および N141I PS-2 のイムノプロッティングによっても、各遺伝子の発現に pHN のコトランスフェクションがほとんど影響を与えないことが確認された (データ省略)。

#### [実施例 4] HN の細胞外分泌

実験の過程で、pHNをトランスフェクトした F11 細胞の培養上清 (CM/F11-pHN ) には、V642I APPを含むFAD遺伝子により誘導される細胞死を有意に抑制する活性があることが判明した。新鮮な培地または空のベクターである pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清 (CM/F11-vec) の存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では高率で細胞死が誘導されたのに対し、CM/F11-pHN存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では、細胞死が劇的に減少した (図 6)。同じことがDTクローンについても観察された。CM/DT29およびCM/DT63は V642I APP により誘導される F11 細胞の細胞死を完全

に抑制したが、CM/DT171 は抑制しなかった。これは、HN または HN をコードする cDNA から転写される HN ポリペプチドは、培養液中に分泌され、V642I APP による誘導される細胞死を抑制することを示唆している。図 7 は、CM/F11-pHN 中の HN の免疫反応性を抗 FLAG 抗体で調べた結果を示している。CM/F11-pHN および pHN をトランスフェクトした細胞のライセートには、HN の免疫反応性を示す 3~4 kDa の単一のバンドを含んでおり、FLAG 融合 HN の予想される分子量 (3837Da; 図 7 左および中央) に一致していた。合成 FLAG 融合 HN ポリペプチド (MAPRGFSCLLLLTSEIDL~~P~~VKRRAGTDYKDDDK : 下線は FLAG タグ) (配列番号: 6) を用いて濃度を決定した結果、HN は CM/F11-pHN 中に 8~9  $\mu$ M の濃度で含まれていることがわかった (図 7 右)。これらの知見は、HN は pHN から転写され培養上清中に分泌されることを示している。

**[実施例 5]** V642I APP により誘導される細胞死における合成 HN ポリペプチドの抑制効果

本発明者は次に、合成 HN ポリペプチド MAPRGFSCLLLLTSEIDL~~P~~VKRRRA (配列番号: 5) を合成し、V642I APP により誘導される神経細胞死において、このポリペプチドを細胞外から加えた場合の作用を調べた。F11 細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、10  $\mu$ M の合成 HN ポリペプチド (sHN) 存在下で培養したところ、V642I APP により誘導される細胞死は劇的に抑制された (図 8)。10nM sHN では極弱い抑制を示すのみであったが、抑制作用は添加する sHN の濃度に依存しており、1~10  $\mu$ M のポリペプチドのレベルで完全な抑制に達した。IC<sub>50</sub> 値は約 100nM であった。この用量依存曲線は、CM/F11-pHN 中に分泌された HN が約 10  $\mu$ M のレベルで V642I APP により誘導される細胞死を効果的に抑制した事実と一致している。

**[実施例 6]** V642I APP により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

本発明者はさらに、sHN の細胞死抑制作用が特異的な一次構造によるものであ

るのかを検討した(図8)。ポリペプチドとして S14G (MAPRGFSCLLLTGEIDLPVKRRA : 下線のGはSから置換されている; HNGと称す) (配列番号: 7) を用いると、V642I APP により誘導される細胞死に対し、10nM以下の濃度において完全なアンタゴナיז効果が認められ、IC<sub>50</sub> は約100pMであった。これに対して、C8A HN ポリペプチド (MAPRGFSALLLTEIDLPVKRRA : 下線のAはCから置換された; HNAと称す) (配列番号: 8) は 100μMまでの濃度において、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制することはできなかった。8位の Cys が重要であることは、8位の Cys を介した HN のダイマー (C8-C8 HN) により得られた結果からも示唆された。C8-C8 HN のアンタゴナיז作用のレベルは、元々の HN と HNAの中間であった。また、対照的に、HN の C末端の KRRA を AAAA に置換した誘導体 (配列番号: 9) は、元々の HNポリペプチドと同様の作用能を示した。これらの結果は、HN の抑制活性に一次構造が本質的な役割をもつと共に、特定のアミノ酸残基が決まった役割を有していることを示している。

#### [実施例7] FAD遺伝子により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

次に、他のFAD遺伝子、すなわち NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2 により誘導される細胞死に対する sHN、合成 HNG (sHNG)、および合成 HNA (sHNA) の効果を調べた。図9に示したように、元々の sHN は3つのFAD遺伝子のいずれにおいても同様の用量-応答特性を示し、1μM の濃度で各FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を妨げた。sHNA は 100μMまでの濃度において、いずれのFAD遺伝子による細胞死もアンタゴナיזしなかった。これに対し、sHNG は 10nM以下の濃度で、各FAD遺伝子による細胞死を抑制する完全な活性を有していた。これは、HN の作用は S14G の置換により 100から1000倍に高められることを示している。V642I APP により誘導される細胞死に対する sHNG の作用 (図8) を合わせて考えると、sHNG は 10nM以下の濃度で、4種の異なるタイプの FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を、完全にアンタゴナיזすることができると結論され

る。

#### [実施例 8] HN の細胞死抑制効果の特異性

HNの作用の特異性を明らかにするため、次に HN cDNA または HN ポリペプチドが、他の神経変性疾患の原因遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイスすることができるかを調べた。72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病 (HD) や、ある種の脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の原因になっていると考えられている (Ikeda, H. et al. (1996) *Nat. Genet.* 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) *Curr. Opin. Neurol.* 10, 285-90)。Q79の発現が神経細胞の細胞死を引き起こすことが報告されているように、Q79 の発現により F11 細胞は細胞死を起こした (図 10)。エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経毒性の試験を行った。この系において、pDN-E/G5H-Q79 を空ベクター (pFLAG) と共に F11/EcR 細胞にトランスフェクションした場合は、エクダイソン処理に応答して細胞死の比率は顕著に増加した (図 10A)。F11/EcR 細胞に、pDN-E/G5H-Q79 を pHN、pHNG、または pHNA と共にトランスフェクトした場合でも、エクダイソン処理により、同じように高い比率の細胞死が誘導された。これに対し、エクダイソンにより誘導されるいすれのFAD遺伝子の発現により引き起こされる F11/EcR 細胞の細胞死も、pHNのコトランスクションにより効果的に抑制された (図 10B)。sHN を用いた実験においても、Q79により誘導される細胞死は抑制されなかった (図 10C)。F11/EcR 細胞に pDN-E/G5H-Q79 をトランスフェクトした場合、4 種のFAD遺伝子による F11/EcR 細胞の細胞死を sHN や sHNG が完全に抑制できる濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下においても、非存在下における場合と同様、エクダイソンによって大幅な細胞死が引き起こされた (図 10D)。

本発明者はまた、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; 家族性ALS) に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキサイドディスムタ

一ゼ (SOD1) の A4T、G85R、または G93A 変異体により誘導される神経細胞死に対する HN の効果を調べた。家族性ALS関連 SOD1 変異体 の発現が哺乳動物神経細胞の細胞死を引き起こすという以前の報告 (Rabizadeh, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) J. Neurosci. 17, 8756-66) と一致して、これらすべての変異体において、それぞれの変異体を発現する cDNA を F11 細胞にトランスフェクトすることにより、有意に細胞死が引き起こされた。そして、各SOD1変異遺伝子に加え、pHNを F11 細胞にコトランスフェクトした場合でも、同様の高い細胞死が誘導された (図 1 1A)。図 1 1B に示したように、100  $\mu$ M のsHN、sHNG、または sHNA のいずれによっても、各家族性ALS関連 SOD1 変異体による細胞死の抑制は認められなかった。これらのデータは、HN は FAD 遺伝子により触発される細胞死実行機構を抑制する細胞内機構を活性化するが、他の神経変性疾患遺伝子による細胞死には機能しないことを示唆しており、HN cDNA および HN ポリペプチドのアンタゴナיז効果は、ADに関連する神経細胞死に共通かつ特異的であることを証拠付ける。

#### 【実施例 9】 初代神経培養の細胞死における HN の抑制効果

本発明者は、HN による、初代培養神経のADに関連する傷害からの保護について調べた。A $\beta$ は老人斑の主要なペプチド成分で、AD脳を病理学的に特徴付ける細胞外沈着物であり、ADの病理機構に関与していると言われている (Selkoe, D. J. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) Neurology 51, S2-17; discussion S65-67)。A $\beta$ 処理は初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Loo, D. T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7951-7955; Gschwind, M. and Huber, G. (1995) J. Neurochem. 65, 292-300)。図 1 2 に示すように、初代培養皮質神経を 25  $\mu$ M のA $\beta$ 1-43 で 48 ～72時間処理すると、N2サブリメントの存在下または非存在下にて、軸索の異常変化 (dystrophic neuritic changes) を伴う広範な細胞死が引き起こされた。初代培養神経を 10  $\mu$ M の sHN で前処理すると、A $\beta$ で誘導される細胞死と共に軸

索の異栄養変化が劇的に抑制された。A $\beta$ 1-43処理により、トリパンブルー排除で測定した細胞死（図13左パネル）と、細胞から放出された LDH により測定した細胞傷害（図14）が観察されたが、10 $\mu$ M の sHN 処理により、細胞の生存を示すこれらの指標はベーサルな状態で観察されたレベルに完全に回復した。同じ条件で、100ng/ml の NGF は、A $\beta$ により誘導される神経細胞の生存およびLDH放出の増加をアンタゴナイズする効果はなかった（データ省略）。A $\beta$ により誘導される神経細胞死のアンタゴナイズに sHN が劇的な効果をあげたのに対して、10 $\mu$ M sHN で神経を同様に処理しても、初代培養神経に対する 20 $\mu$ M のエトポサイド（etoposide）の毒性を防ぐことはできなかった（図13右パネルおよび図14）。エトポサイドは抗癌剤であり、初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている（Nakajima, M. et al. (1994) Brain Res. 641, 350-2）。これらの知見は、HN は A $\beta$ 1-43 により誘導される神経細胞死を、選択的な機構でアンタゴナイズするという考えを支持する。F11 細胞を用いた FAD 遺伝子の実験で指摘したのと同様に、10nM sHN<sub>G</sub> は、A $\beta$ 1-43による細胞死および軸索の異栄養変化から神経を完全に保護したが、10nM sHN または 10 $\mu$ M sHN<sub>A</sub> は、いずれも A $\beta$ の神経毒性に対し効果を示さなかった（図12）。これらのデータは、細胞傷害のアッセイである LDH 放出アッセイ（図14）およびトリパンブルー排除アッセイ（図13）により確かめられたのみならず、生細胞のアッセイであるカルセイン（Calcein）染色アッセイ（図15および16）によっても確かめられた。このように、HN は初代培養神経においても、クローン化された神経細胞における場合と同様に効果を有していることが示された。さらに、これらのデータから、HN の構造を特異的に認識する受容体（群）が、F11細胞と初代培養神経に共通して存在していると考えることができる。

#### [実施例 10] HN mRNA の発現

$\beta$ -actin mRNAをポジティブコントロールとして、様々な組織におけるHN mRNA の発現を調べた。ヒト組織のノーザンプロット解析により、HN mRNAは心臓、骨格

筋、腎臓、および肝臓において顕著に発現していることが判明した（図17a）。それより少ないが、依然として有意な発現が脳および消化管（gastrointestinal tract）に認められた。胸腺、脾臓、および末梢血白血球を含む免疫系にはほとんどmRNAは検出されなかった。発現している主要なmRNAのサイズは約1.6kbであり、これは、HNを含む最も長いDT cDNAの予想されるサイズに相当する。約3kbおよび約1kbのサイズの異なるmRNAも存在した。HNの3'領域をコードし、HNをコードしていないDT77（図1参照）をプローブにした場合も、またHNの-440から-422の5'領域に対するアンチセンスプライマー（GGGTGTTGAGCTTGAACGC／配列番号：10）をプローブとした場合も、上記と同様の結果が得られ、これら全てのバンドが検出されたことから、これらのmRNAは全長HN mRNAとそのスプライシングバリエントであると予想される。ヒト心臓cDNAライブラリーから、本発明者は DT44 の位置と事実上同一であり、1kbを超えるcDNAを幾つか単離した。マウス組織においても、以下の点を除き類似した結果を得た（図18）。第一点はマウスの骨格筋および肝臓はヒト組織に比べHN mRNA量が少なかったことである。しかしながら、他のマウスの骨格筋および肝臓のHN mRNAは多かった（データ省略）ことから、量的な差異は個体の条件が影響することが考えられる。第二点は、マウス心臓および腎臓において、1kbの小さなmRNAが、1.6kbのものと同等かそれ以上発現していることがある。マウス脳、心臓、および骨格筋では特異的に、約0.4kbのmRNAがさらに発現していた。脳の発現領域を詳しく解析した結果、脳の各領域の中では、小脳および後頭葉で比較的多量のmRNAが発現していた。これらの結果は、HN mRNAは主に中枢神経系以外の器官で産生されていることを示している。このことからして、HNは血流に分泌され脳神経に運ばれている可能性が考えられる。または、脳内で局所的に合成されるHNが保護作用を発揮する可能性も想定される。これに関しては、AD脳で神経細胞死に対し最も抵抗力を示す領域である小脳および後頭葉で HN mRNA が最も合成されていることは興味深い。

### 産業上の利用の可能性

本発明によって、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、該疾患の抑制遺伝子または該疾患の抑制ポリペプチドのスクリーニング方法が提供された。疾患生物に由来する試料を用いることにより、該疾患に対する抑制遺伝子や抑制ポリペプチドを効率的にクローニングすることが可能となる。また、細胞死を伴う疾患に罹患した生物に由来する核酸およびポリペプチド、ならびに該核酸がコードするポリペプチドの疾患抑制効果を検査することにより、該核酸およびポリペプチドの特性を解析することができる。

## 請求の範囲

1. 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸またはポリペプチドを検索することを特徴とする、疾患抑制遺伝子または疾患抑制ポリペプチドのスクリーニング方法。
2. 疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、
  - (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、
  - (b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、
  - (c) 該効果を有する核酸を選択する工程、を含む方法。
3. 疾患抑制ポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする疾患抑制遺伝子のスクリーニング方法であって、
  - (a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、
  - (b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、
  - (c) 該効果を有するポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を選択する工程、を含む方法。
4. 工程 (a) あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程 (b) において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、請求項 2 または 3 に記載の方法。
5. 疾患が脳神経系疾患である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
6. 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、請求項 5 に記載の方法。
7. 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、請求項 1 から 6 のいず

れかに記載の方法。

8. 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来する核酸を細胞で発現させる工程、

(b) 該細胞における、該核酸の発現による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法。

9. 疾患に対する抑制効果を検査する方法であって、

(a) 細胞死を伴う疾患に罹患した生物の患部またはその周辺の細胞に由来するポリペプチド、または該細胞に由来する核酸がコードするポリペプチドを細胞に投与する工程、

(b) 該細胞における、該ポリペプチドの投与による該疾患に対する抑制効果を検出する工程、を含む方法。

10. 工程 (a) あるいはその前または後において該疾患に関連する細胞死を誘導し、工程 (b) において該細胞死の抑制を指標に該疾患に対する抑制効果を検出する、請求項 8 または 9 に記載の方法。

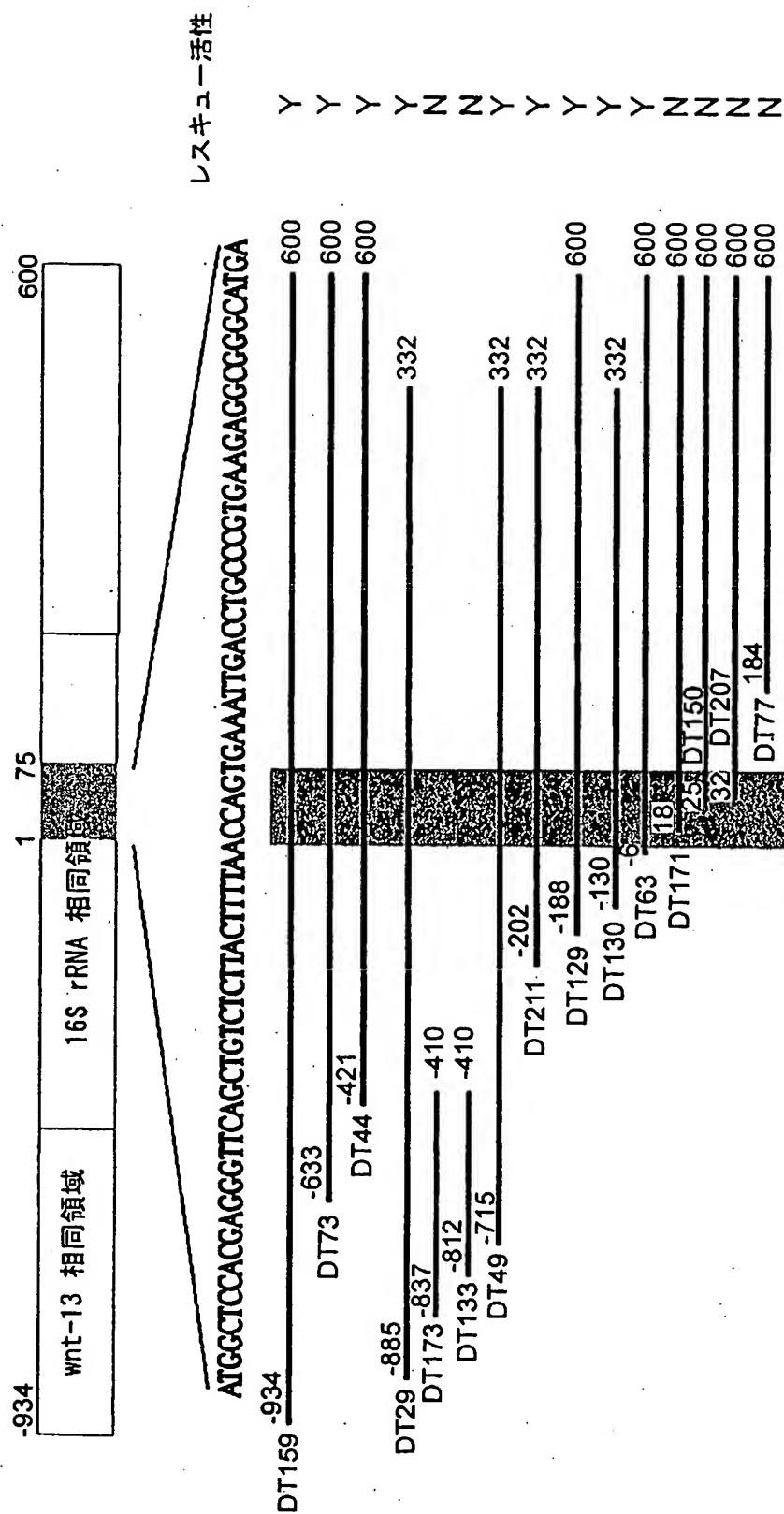
11. 疾患が脳神経系疾患である、請求項 8 から 10 のいずれかに記載の方法。

12. 脳神経系疾患がアルツハイマー病である、請求項 11 に記載の方法。

13. 核酸またはポリペプチドが神経または脳に由来する、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の方法。

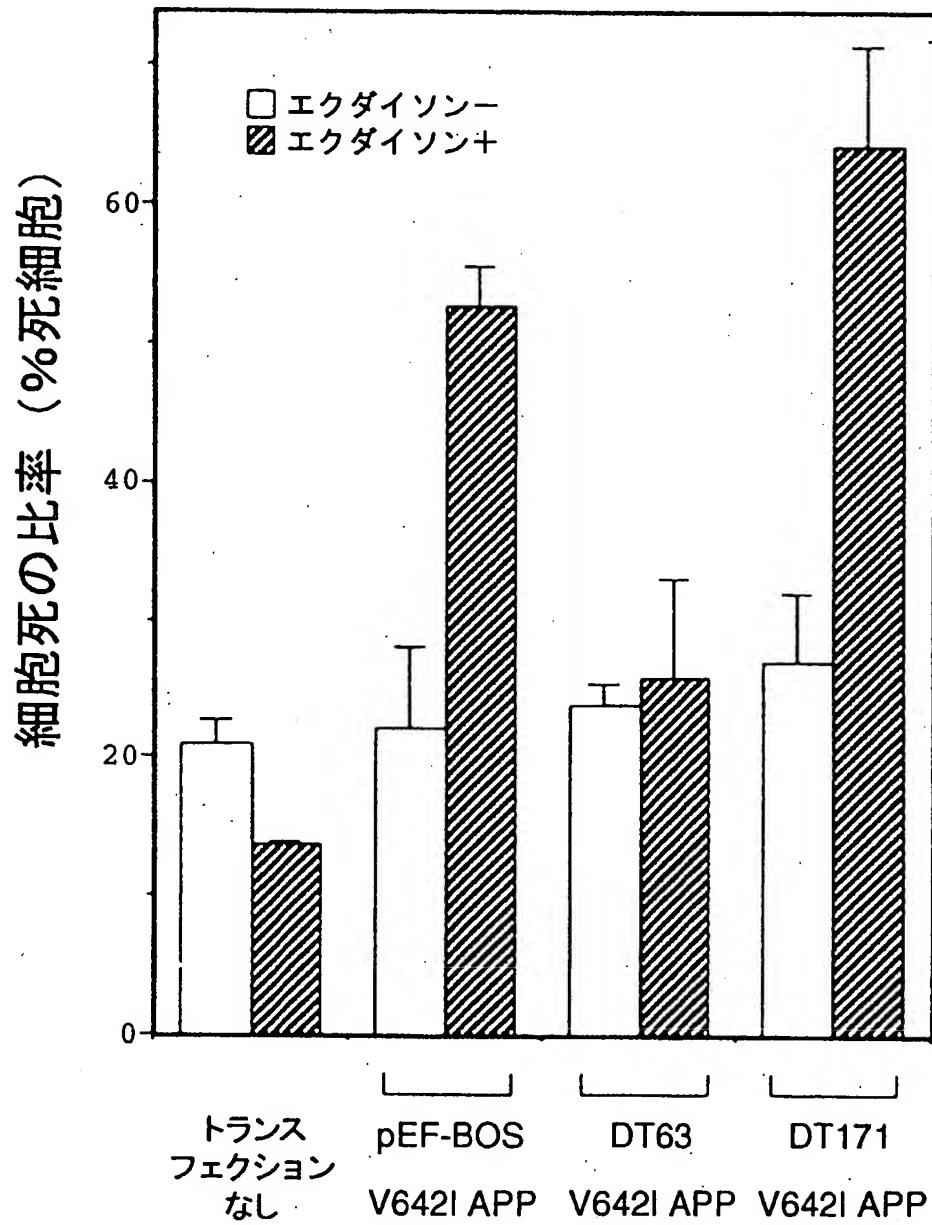
1 / 18

図 1



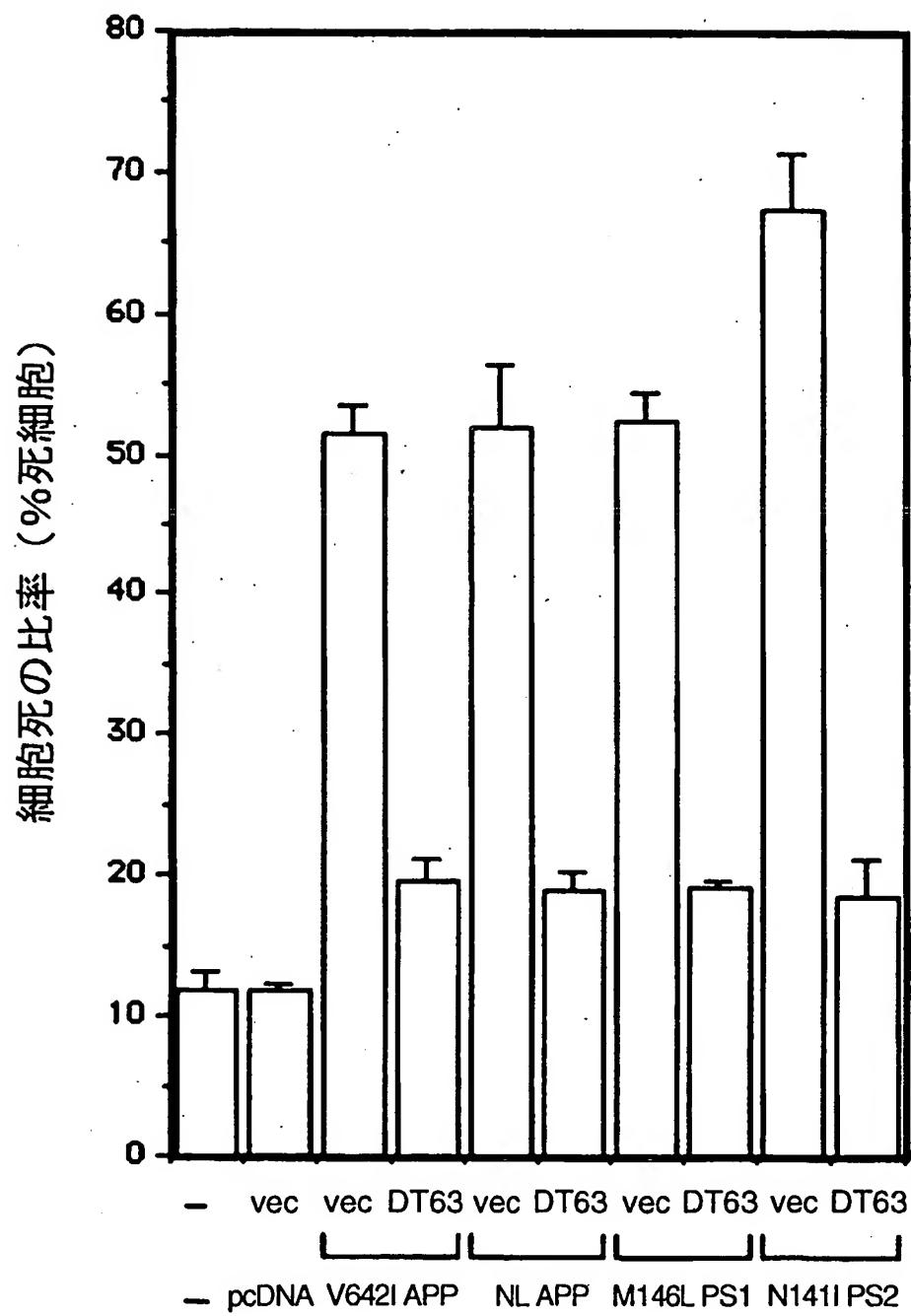
2 / 18

図 2



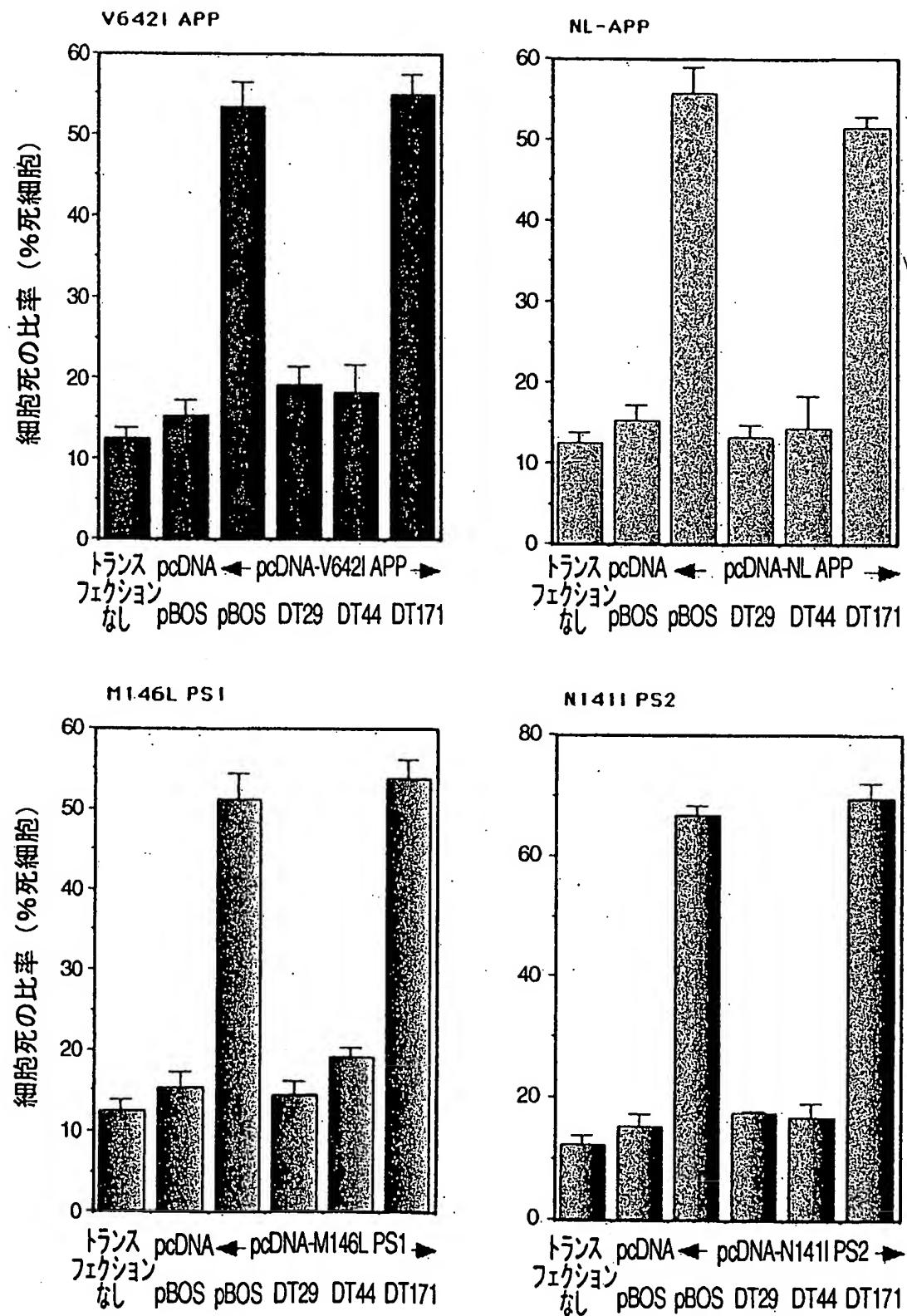
3 / 18

図3



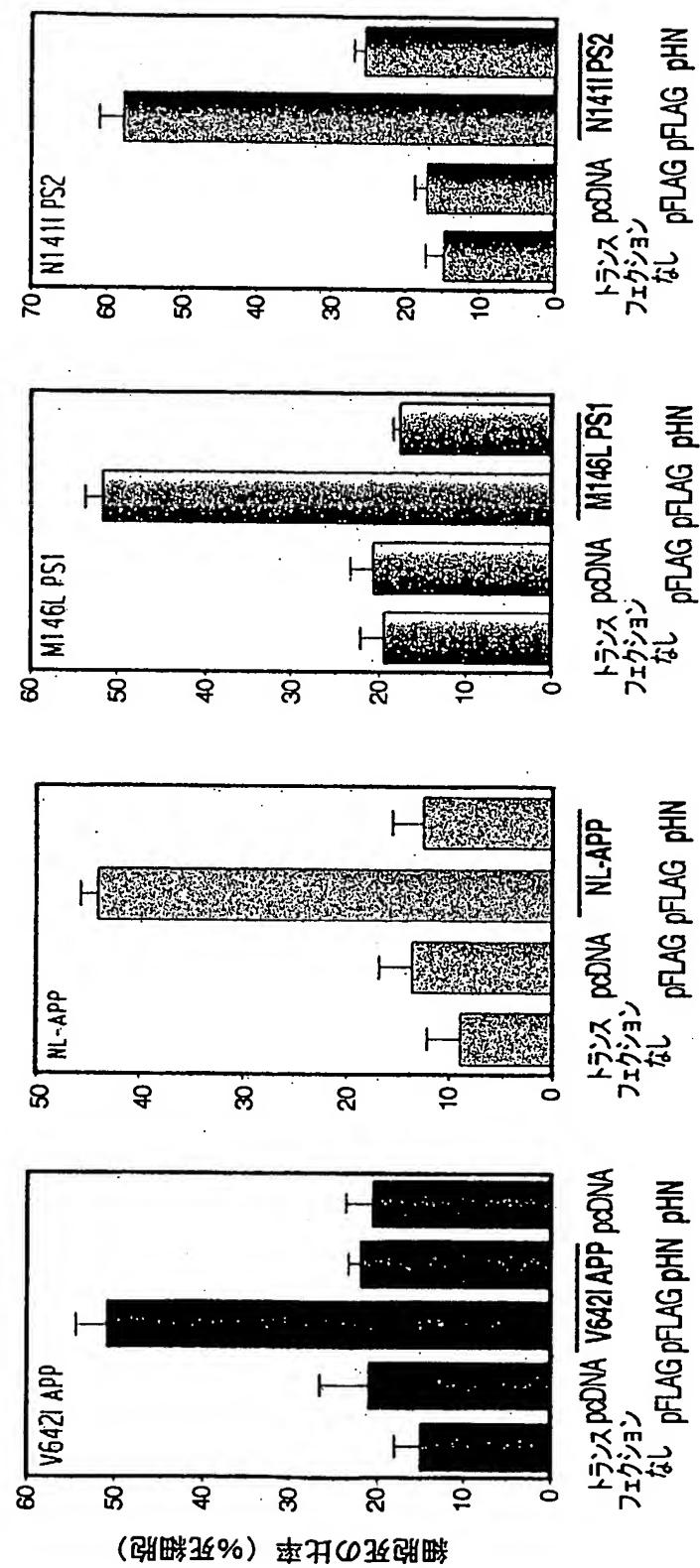
4 / 18

図 4



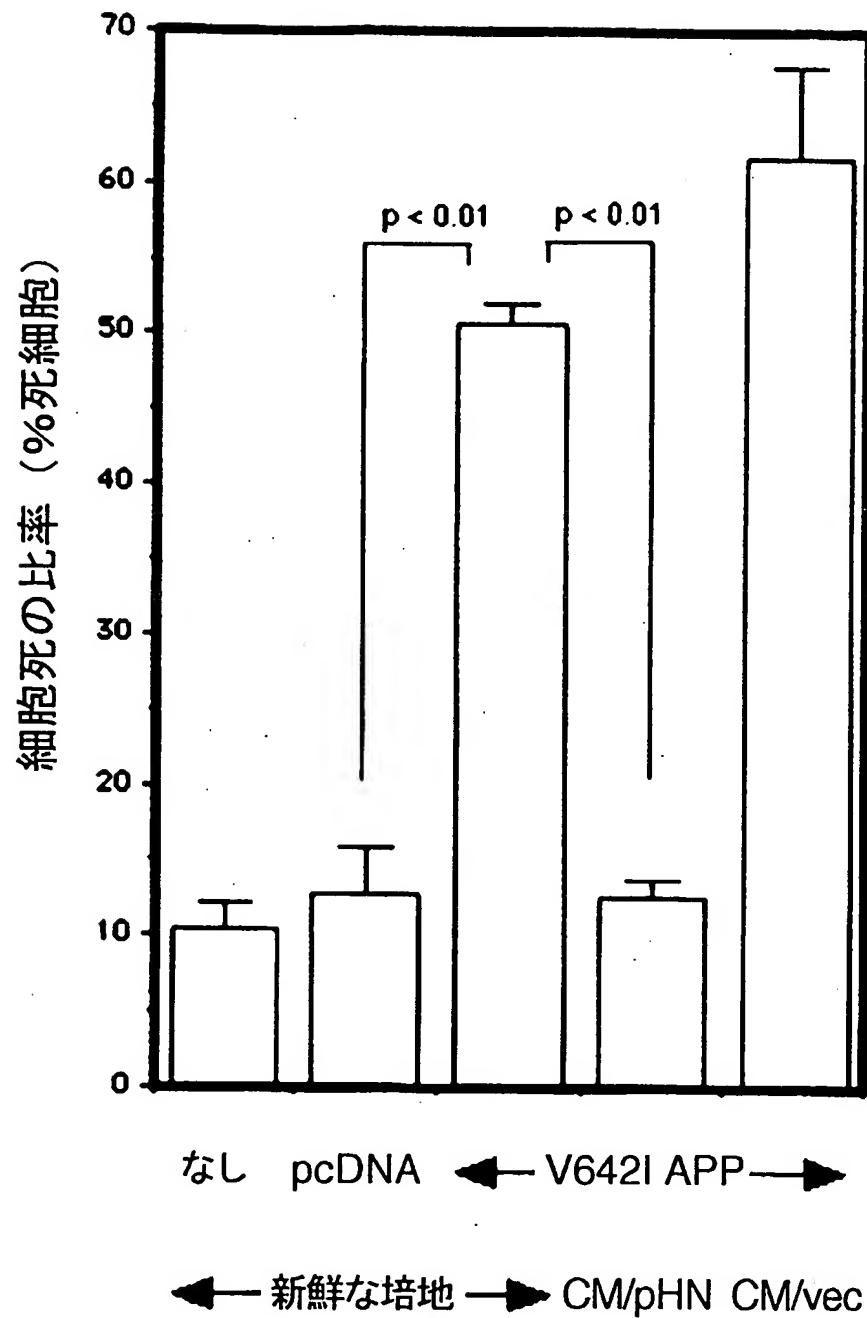
5 / 18

図 5



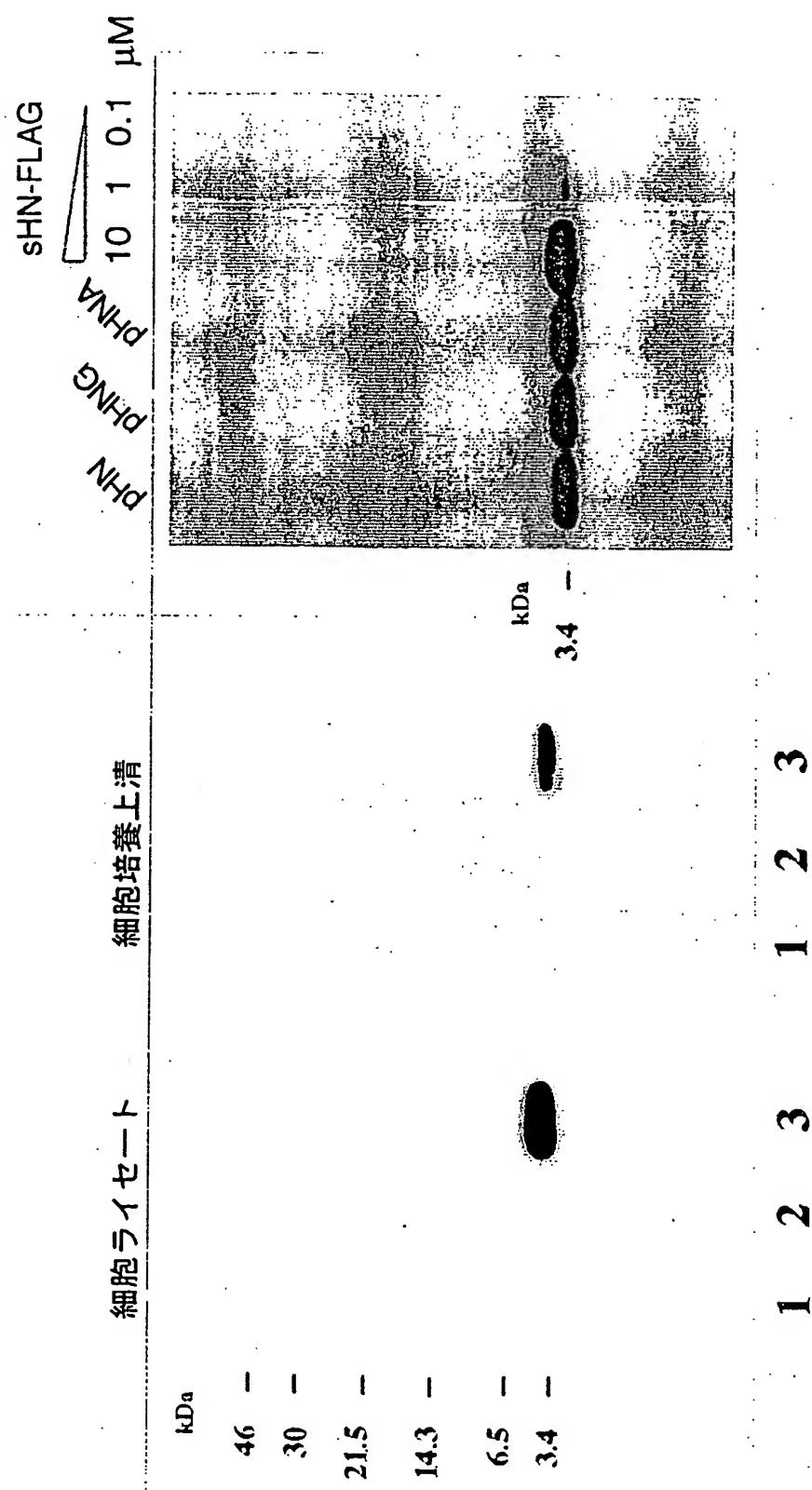
6 / 18

図 6



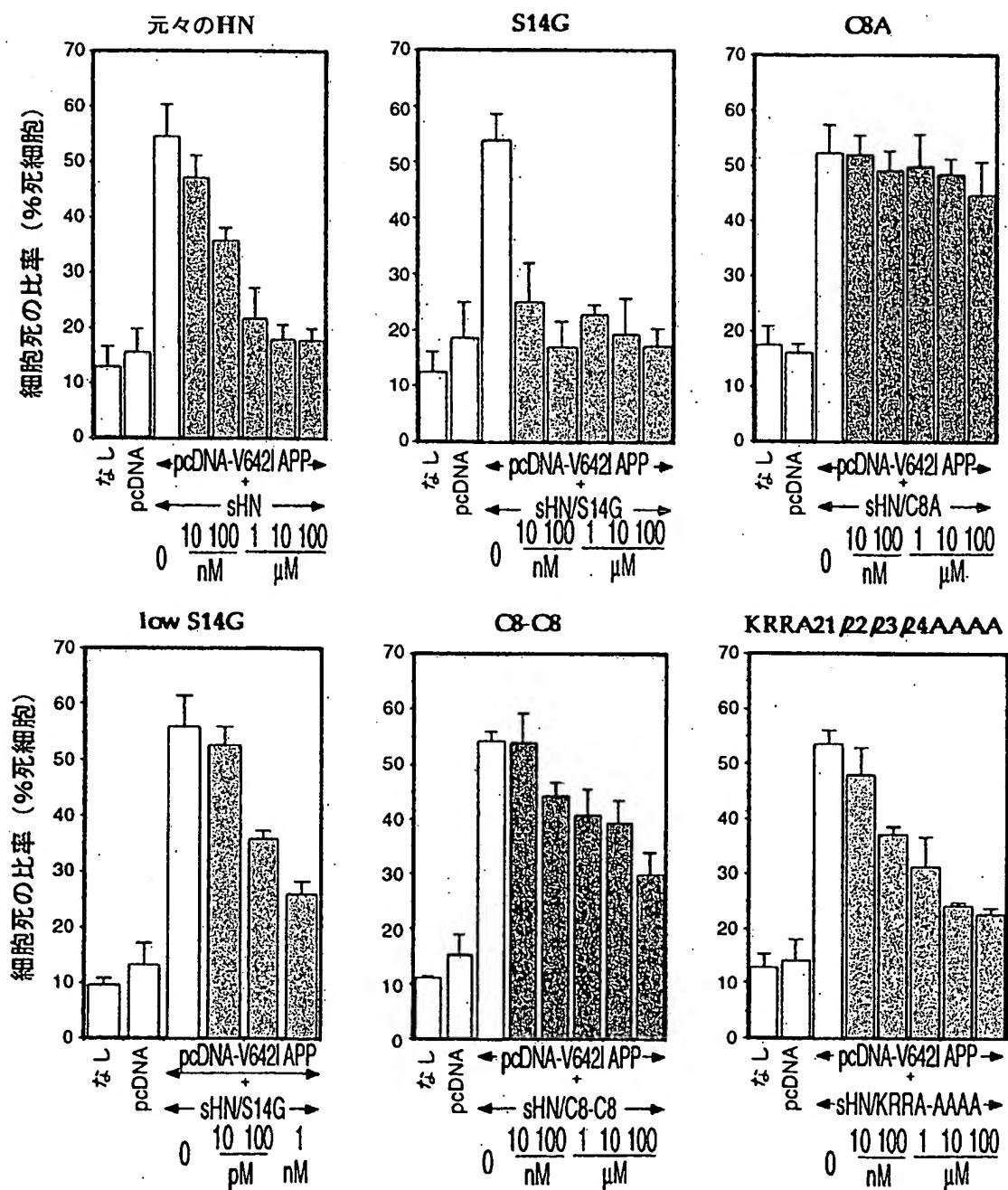
7 / 18

図7



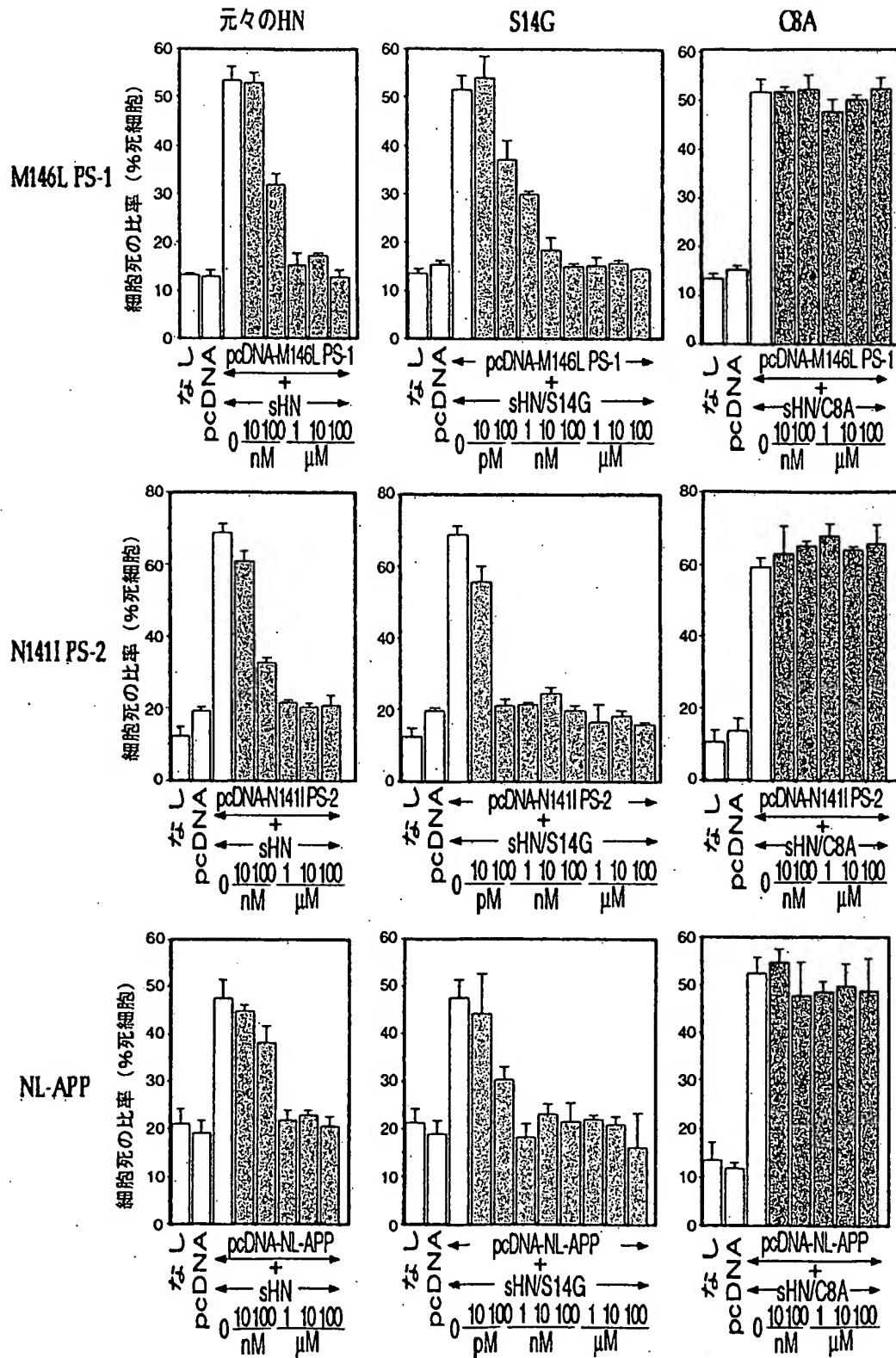
8 / 18

図 8



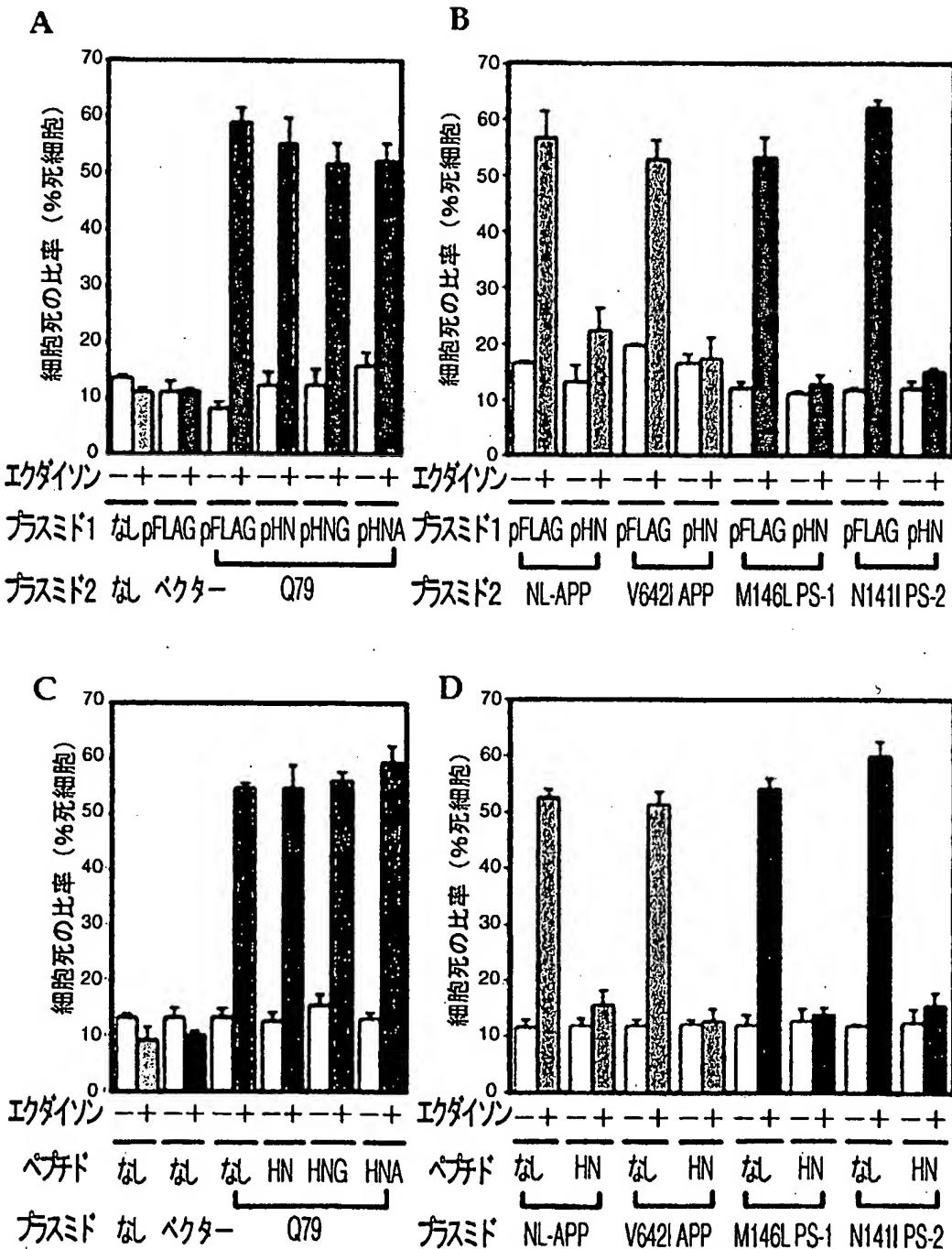
9 / 18

9



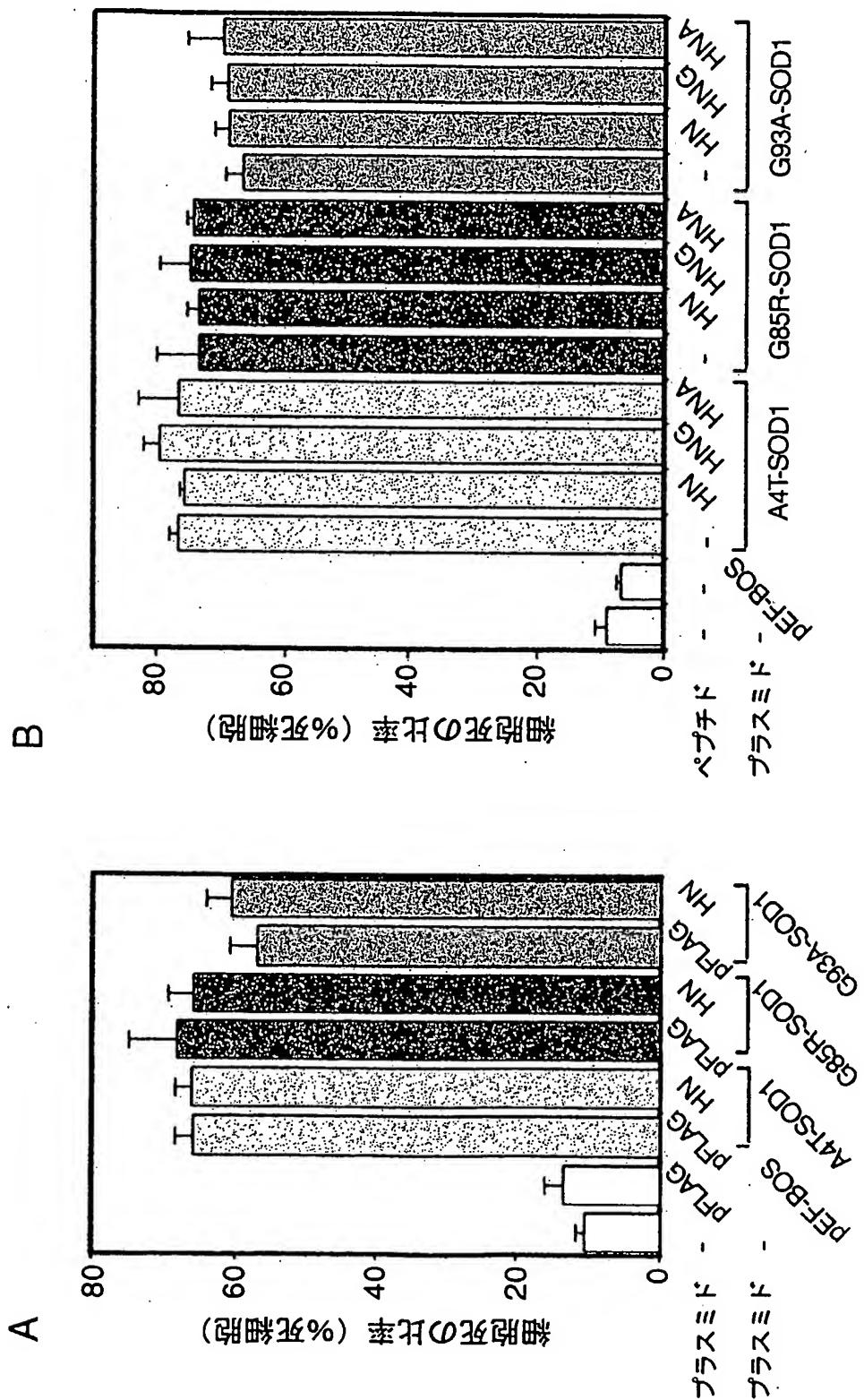
10 / 18

10



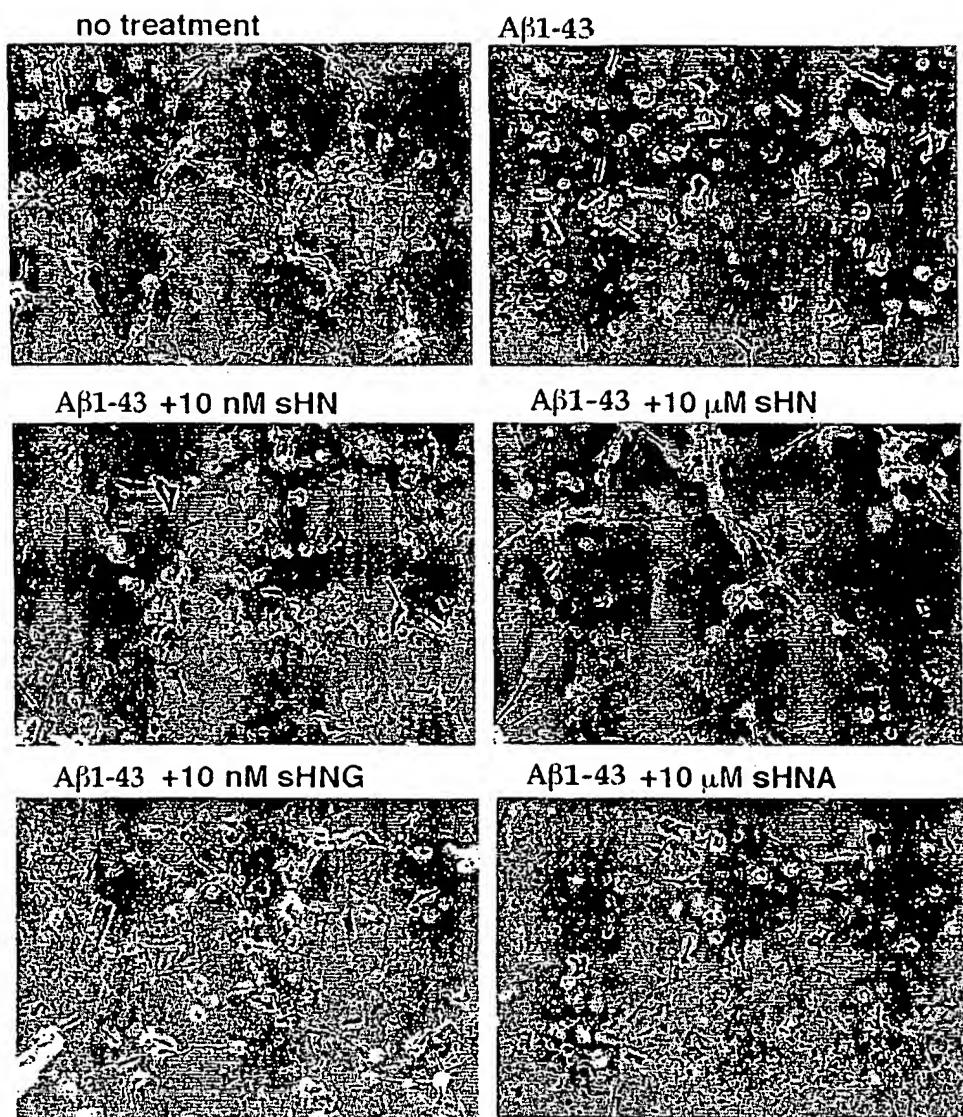
11/18

図 11



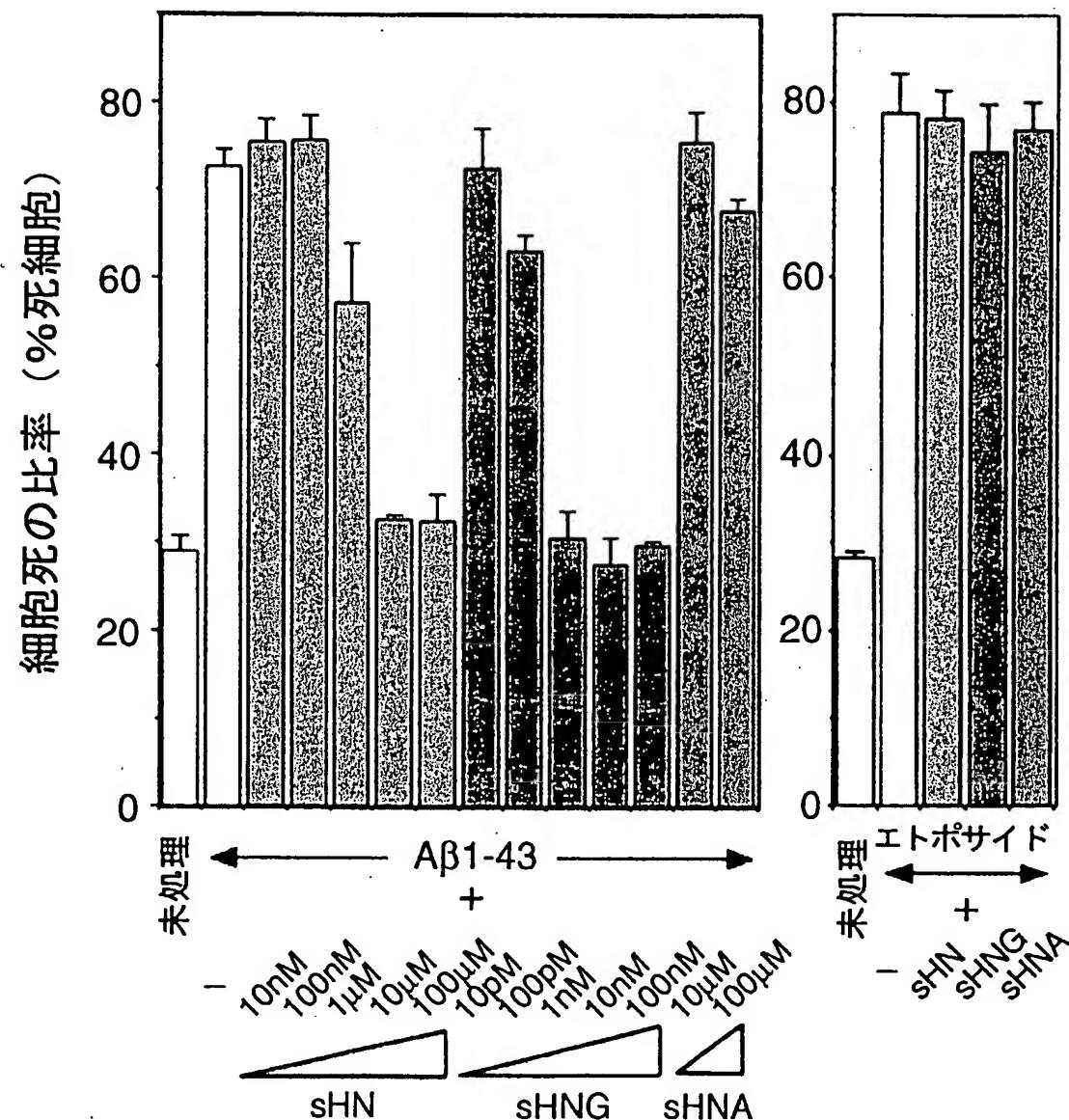
12 / 18

図 12



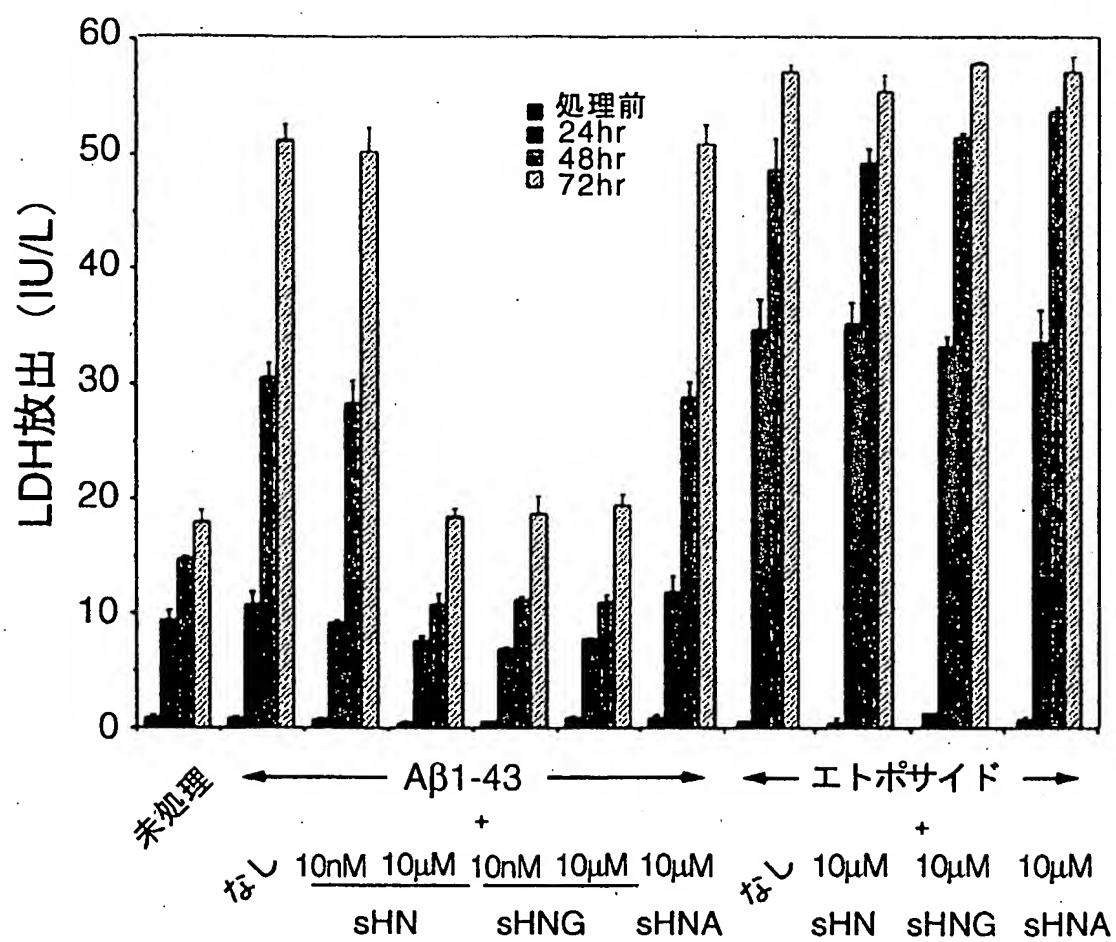
13 / 18

図13



14 / 1.8

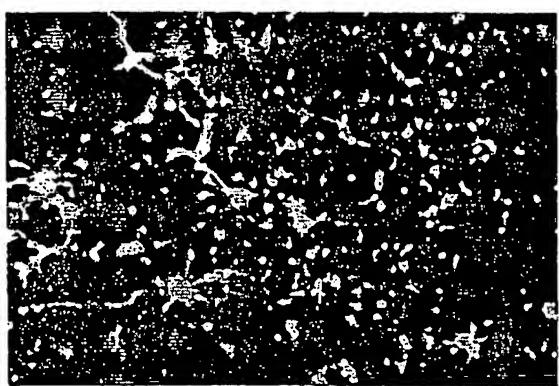
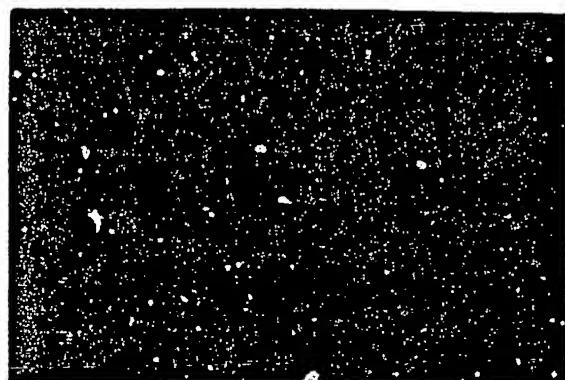
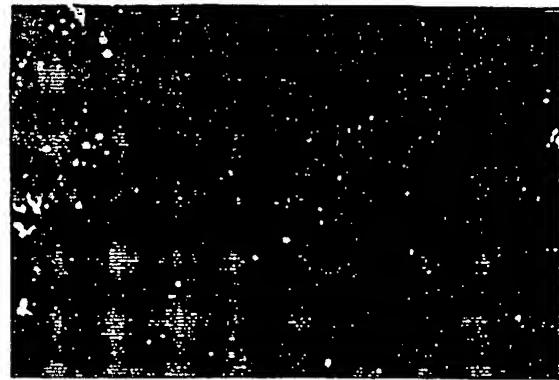
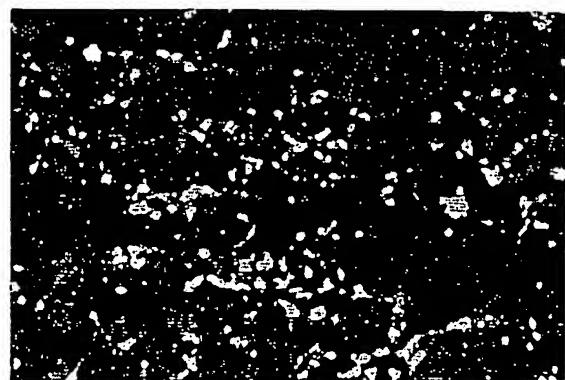
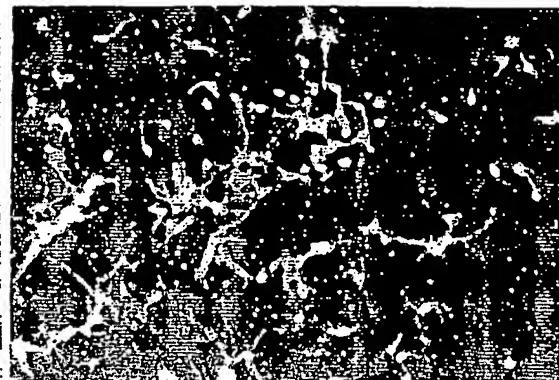
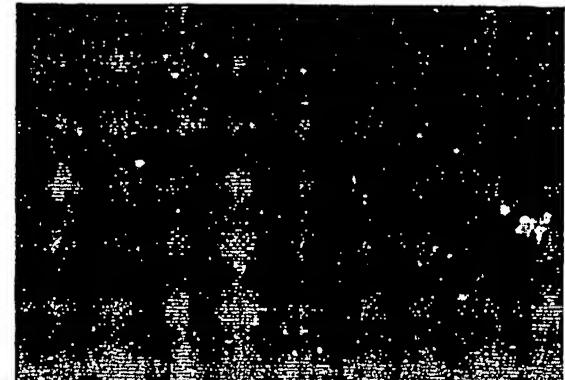
図 14



15 / 18

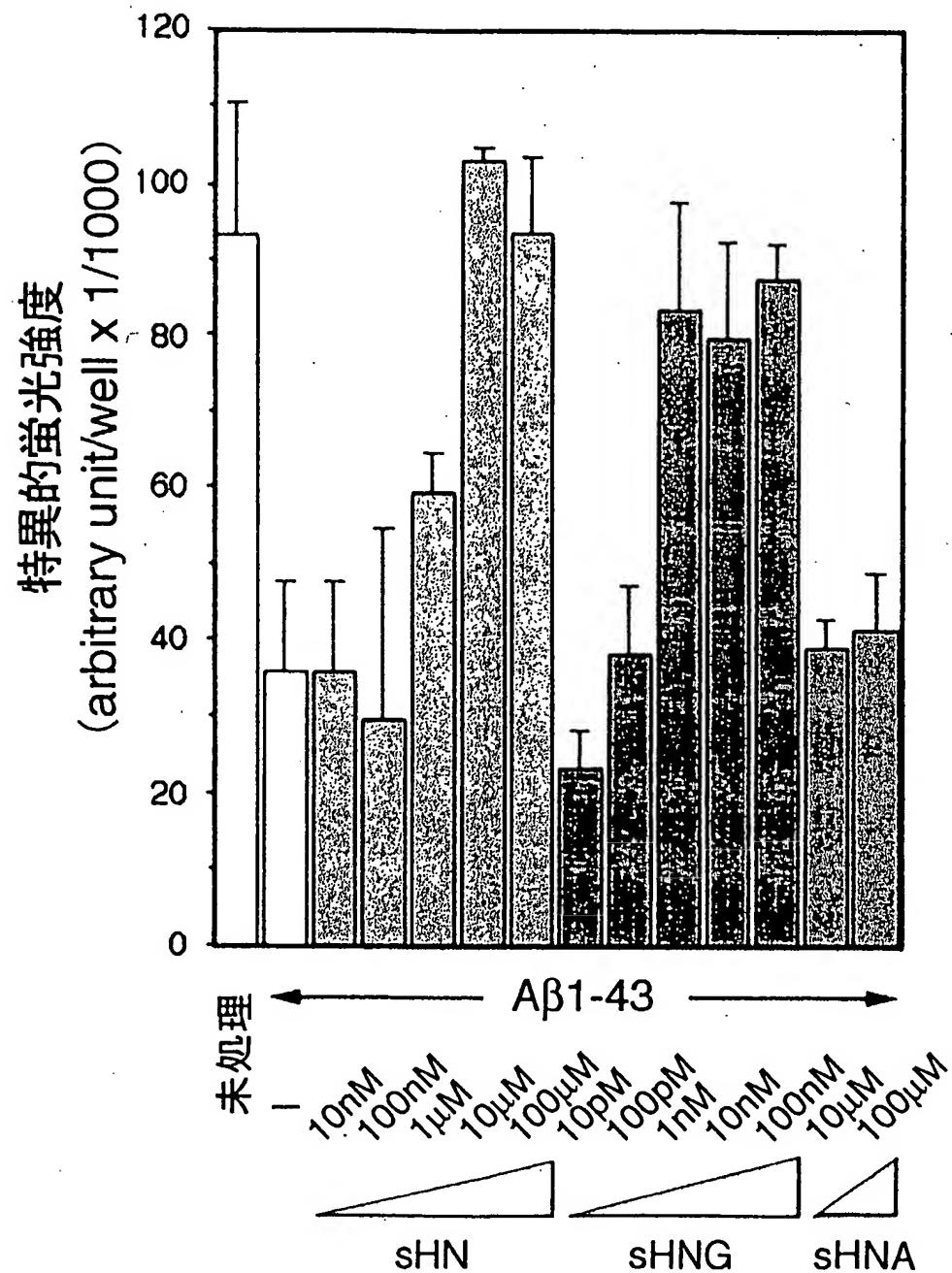
図 15

no treatment

A $\beta$ 1-43A $\beta$ 1-43 + 10 nM sHNA $\beta$ 1-43 + 10  $\mu$ M sHNA $\beta$ 1-43 + 10 nM sHNGA $\beta$ 1-43 + 10  $\mu$ M sHNA

16 / 18

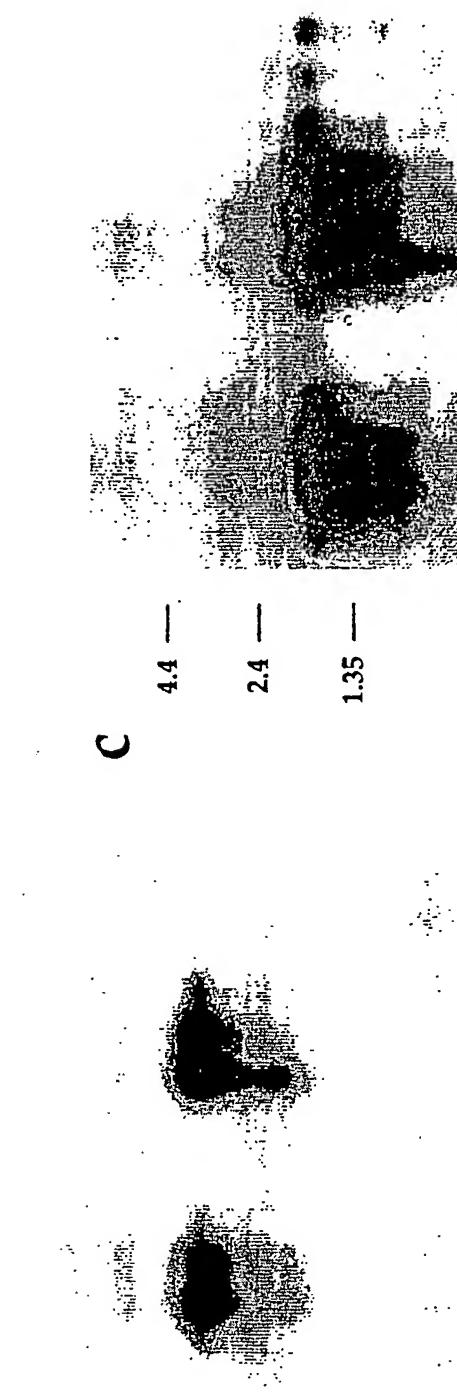
図 16



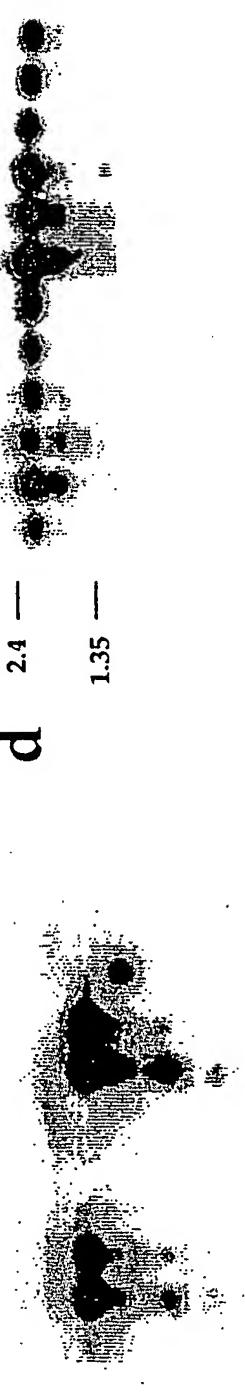
17 / 18

図 17

a      kbp      1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

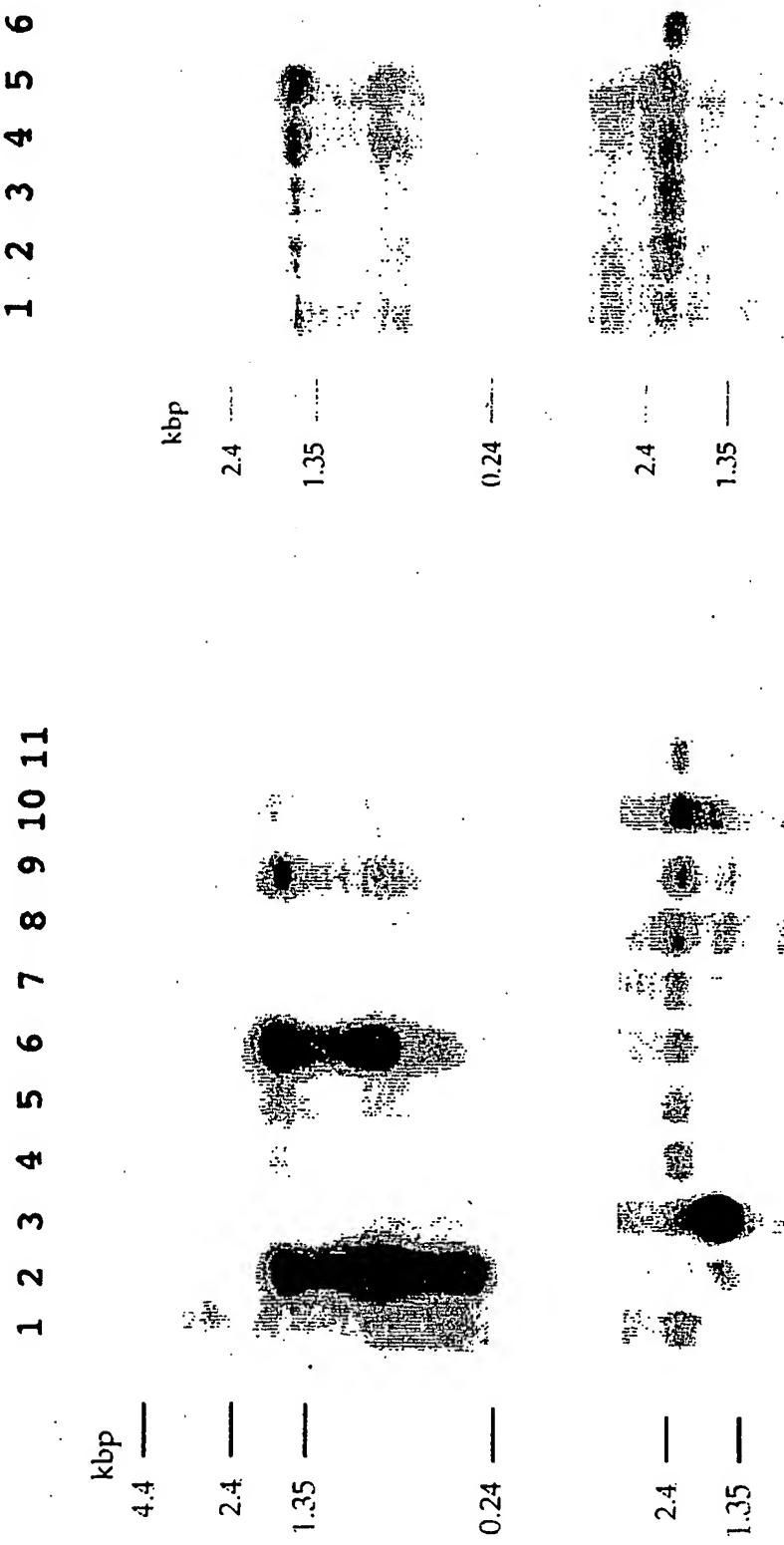
4.4 —  
2.4 —  
1.35 —C      4.4 —  
2.4 —  
1.35 —

b

4.4 —  
2.4 —  
1.35 —

18 / 18

図 18



## SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Methods for screening of disease-suppression genes

<130> KUV-102DP1PCT2

<140>

<141>

<150> JP 1999-264679

<151> 1999-09-17

<150> JP 2000-201456

<151> 2000-06-29

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 1

aattcaccat ggctccacga gggttcagct gtctcttact tttaaccagt gaaattgacc 60  
tgcccgtaa gaggcgggca ggtac 85

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 2

ctgccccgcct cttcacgggc aggtcaattt cactggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60  
ctcggtggagc catggtg 77

<210> 3

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 3

ctgccccct cttcacgggc aggtcaattt cactggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60  
ctcggtggc catgtggtg 79

<210> 4

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(72)

<400> 4

atg gct cca cga ggg ttc agc tgt ctc tta ctt tta acc agt gaa att 48  
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15

gac ctg ccc gtg aag agg cgg gca tga

75

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

## synthesized sequence (sHN-FLAG)

<400> 6  
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala Gly Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp  
20 25 30

Asp Lys

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (HNG)

<400> 7

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala  
20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (HNA)

<400> 8

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala  
20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 9

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile  
1 5 10 15Asp Leu Pro Val Ala Ala Ala Ala  
20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

&lt;400&gt; 10

gggtgttgag cttgaacgc

19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06313

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K38/10, 38/17  
A61P25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | EP, 616032, A1 (MITSUBISHI KASEI CORP),<br>21 September, 1994 (21.09.94),<br>Full text<br>& JP, 6-329551, A & US, 5837853, A   | 1-13                  |
| A         | JP, 11-146743, A (Japan Science and Technology Corp.),<br>02 June, 1999 (02.06.99),<br>Full text (Family: none)  | 1-13                  |
| A         | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998<br>Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic<br>actions of mutant presenilin 1:Reduced oxidative stress<br>and preserved mitochondrial function", pp.3227-3232 | 1-13                  |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| • Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
|---|--|

Date of the actual completion of the international search  
12 December, 2000 (12.12.00)Date of mailing of the international search report  
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/09, C12Q1/02, 1/68, A61K38/10, A61K38/17  
A61P25/28, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/00- / 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | EP, 616032, A2<br>(MITSUBISHI KASEI CORP)<br>21. 9月. 1994 (21. 09. 94)<br>全文<br>& JP, 6-329551, A & US, 5837853, A | 1-13             |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   |                  |
| A                     | J P, 11-146743, A<br>(科学技術振興事業団)<br>2. 6月. 1999 (02. 06. 99)<br>全文 (ファミリーなし)  | 1-13             |
| A                     | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998<br>Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic<br>actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and<br>preserved mitochondrial function", p. 3227-3232 | 1-13             |

## DESCRIPTION

## SCREENING METHOD FOR DISORDER SUPPRESSOR GENES

5 Technical Field

The present invention relates to a method of screening for a disorder suppressor gene or a disorder suppressor polypeptide.

Background Art

10 Current progress in human genome analysis has lead to the identification of genes associated with a variety of disorders. The analyses of these disorder-associated genes are revealing complicated relationships between the actions of causative gene(s) (or the aberrant action of normal genes associated with disorders) and the 15 action of gene(s) that suppress disorders. That is, almost all the disorders occurring in humans are thought to be caused by a collapse in the balance between the action of disease-causing aberrant genes (or aberrant action of normal genes associated with disorders) and the action of normal suppressor genes that compete with aberrant genes.

20 Such a view-point may be applicable to almost all the disorders ranging from stomach ulcer to neurodegenerative diseases, indicating, in other words, a possible presence of normal genes that suppress a majority of disorders (or disorder suppressor genes) in the genome. Needless to say, development of an efficient method of screening for 25 such genes undoubtedly would enable the discovery and identification of useful genes expressing specific therapeutic effects on a variety of human disorders, including intractable diseases for which no treatment has yet been found.

Conventionally, a suppressor gene for a particular disorder was 30 screened mostly by using a method that searched for a molecule that suppressed a biochemical function of a causative gene using the biochemical function as an index. However, such a method cannot be applied to cases where the biochemical function of the causative gene has not been elucidated. Furthermore, even if the biochemical 35 function has been identified, the search for drugs based on the function may not directly lead to a molecule capable of curing the

disorder when the biochemical function is not the direct cause of the onset of the disorder. In fact, even if a gene has been proved to be a causative of a particular disorder from epidemiological, genetic, or other studies, the biochemical function of the gene cannot 5 be often identified, and, moreover, even if it is identified, it is difficult to clarify whether the identified function is the direct cause for the onset of the disorder. For example, although it has been demonstrated that a mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene, which has been identified as one of the Parkinson's disease (PD)-associated 10 genes (Polymeropoulos, M. H. et al., 1997, *Science* 276: 2045-2047), is definitely the gene that causes the onset of PD, the biochemical function of  $\alpha$ -synuclein has not so yet been elucidated. An Alternative example is the ATM gene, causative of ataxia 15 telangiectasia (spinocerebellar degeneration with capillaractasia), in which although the only known biochemical function of ATM is a PI3 kinase-like activity, it is entirely unclear whether the aberration of this biochemical function causes the onset of the disorder. Thus, it is extremely difficult to develop a therapeutic molecule for a disease based on the mere identification of a causative 20 gene.

Systems that attempt screening through a more functional method have been developed. One of them is a method of screening for genes and molecules that suppress cell death induced by disease-causing genes, which has been conventionally referred to as the death-trap 25 method (D'Adamio, L. et al., *Semin. Immunol.* 1997, 9: 17-23). However, due to the extremely low efficiency in screening when using only the conventional death-trap method, this method has not so far become an effective screening method.

As described above, almost all the disorders occurring in humans 30 are thought to be caused by a collapse in the balance between the action of disease-causing aberrant genes (or aberrant action of normal genes associated with disorders) and the action of normal suppressor genes that compete with aberrant genes. Therefore, it is highly likely 35 that suppressor genes for a majority of disorders are present in the genome. Thus, screening of a cDNA library covering the human genome using the death-trap method may theoretically lead to the discovery

of disorder suppressor genes. However, it is extremely difficult to discover such a suppressor gene out of the vast genome even by conducting this screening method, and in fact, no disorder suppressor gene has so far been found using the death-trap method even several 5 years after its establishment. Therefore, a method capable of more efficiently screening disorder suppressor genes has been anticipated.

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide a method 10 for efficiently screening for a disorder suppressor gene or disorder suppressor polypeptide. Furthermore, another objective of this invention is to provide a method for testing disorder suppressor genes or polypeptides.

To solve the above-described issues, the present inventor aimed 15 to develop a method for efficiently screening for a suppressor gene for a disorder in which cell death is a pathological feature (cell death can be the main or a part of the pathological state), that is, a disorder that accompanies cell death. For a more efficient screening of a disorder suppressor gene, the present inventor thought 20 it important to use a more condensed group of candidate disease suppressor genes rather than merely using a cDNA library. In disorders that accompany cell death, a pathological feature is the degeneration of cells in affected areas of organs or tissues in which cell death occurs. Usually, such diseased organs and tissues may not 25 be suitable objects for screening for a disorder suppressor gene, even though they can be objects for screening for a disease-causing factor. In this regard, the present inventor focused their attention on the fact that in disorders accompanying cell death, cell death does not necessarily occur in all the cells contained in the affected 30 area. They also thought that, in the relatively slightly affected tissues as well as normal tissues in the vicinity of the affected area, the disease-causing factor is not necessarily absent, but pathological symptoms may not have developed in spite of the presence 35 of the causative factor. That is, although it appears natural that normal tissues do not develop pathological symptoms, tissues in the vicinity of the affected area may sufficiently express a disorder

suppressor gene preventing the development of pathological symptoms. Based on such a concept, it should be able to construct a condensed library of disease-suppressor genes by preparing mRNA from the affected area or tissues in its vicinity, and constructing a cDNA library based thereon.

To prove this hypothesis, the present inventor screened a disorder suppressor gene for Alzheimer's disease (AD) as an example of a disorder that accompanies cell death. AD is a neurodegenerative disorder for which no effective therapy has so far been established. 10 AD is clinically characterized by progressive amnesia and dysgnosia, and pathologically by extensive neuronal loss, intraneuronal tangles, and extracellular senile plaques containing a congophylic dense core. So far, four different kinds of mutant genes that cause the early-onset familial AD (FAD): V642I/F/G APP (the numbering is for APP<sub>695</sub>, 695 15 amino acid version of APP), K595N/M596L APP (NL-APP), presenilin (PS)-1 mutants, and PS-2 mutants (Shastry, B. S. and Giblin, F. J. (1999) Brain Res. Bull. 48, 121-127) have been reported. Expression of these mutant genes induces cell death in nerve cell lines or primary cultured neurons (Yamatsuji, T. et al., (1996) Science 272, 1349-1352; 20 Zhao, B. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 47, 253-263; Luo, J. J. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 55, 629-642; Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713; Wolozin, B. et al. (1998) Neurobiol. Aging 19, S23-S27; Guo, Q. et al., (1996) Neuroreport 8, 379-383; Zhang, Z. et al. (1998) Nature 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) Proc. Natl. 25 Acad. Sci. USA 96, 4125-4130). As it has been generally accepted that progressive neuronal death accounts for most of the clinical symptoms of Alzheimer's disease, the elucidation of the pathological mechanism that causes neuronal death in AD, and the prevention thereof, are mandatory to establish an effective AD therapy that has so far been 30 unavailable.

The present inventor has hitherto established a nerve cell line (F11/EcR/V642I) that inducibly expresses familial Alzheimer's disease mutant V642I amyloid precursor protein (V642I APP) (cf. International Patent Publication No: WO00/14204). In this cell line, 35 V642I APP is expressed in F11 neurons in response to ecdysone treatment. Cell death occurred in almost all the F11/EcR/V642I cells during

incubation with ecdysone for 2 - 3 days, while it scarcely occurred in cells of the control incubation in which V642I APP expression is not induced. The present inventor used these F11/EcR/V642I cells in the screening for a gene that acts as an antagonist against neuronal 5 death induced by V642I APP.

First, poly(A)<sup>+</sup>RNA was prepared from the occipital lobe derived from a patient diagnosed with sporadic Alzheimer's disease. In Alzheimer's disease, where the principal site of neuronal death is the cerebrum, the neurons of the occipital lobe are hardly damaged. 10 After the reverse transcription of poly(A)<sup>+</sup>RNA to cDNA, it was incorporated into an expression vector to construct a cDNA library, which was transfected to the above-described F11/EcR/V642I cells to induce the expression of V642I APP upon treatment with ecdysone. After 72 h, plasmids were recovered from cells surviving neuronal 15 death. As a result of repeating the screening procedure using this death-trap method, the present inventor succeeded in identifying a plurality of genes capable of preventing V642I APP-inducible neuronal death.

It was revealed that humanin (HN) cDNA, one of the genes thus 20 isolated encodes a novel polypeptide comprising 24 amino acid residues, which is capable of suppressing AD-associated neuronal death, that is, neuronal death inducible by all kinds of known early-onset familial AD-associated genes (V642I APP, K595N/M596L APP, M146L presenilin (PS)-1 and N141I PS-2) and A $\beta$ 1-43. It was found that HN 25 mRNA was produced in the central nervous system as well as in several other organs. It was also revealed that, upon transfection of neurons with HN cDNA, peptide thus produced is secreted into the culture medium. This culture supernatant contained a sufficient amount of activity to significantly protect neurons from the V642I APP-induced death. 30 A synthetic HN polypeptide also showed a neuron-protecting activity against the four different types of AD-associated genes in a similar dose-dependent manner.

Thus, the present inventor has proved that, by screening samples derived from patients suffering from a disorder that accompanies cell 35 death, suppressor genes for the disorder can be obtained. This screening method performed by the present inventor is applicable to

not only AD, but also all disorders that accompany cell death as a part of its clinical symptoms. That is, the present invention enables highly efficient screening of suppressor genes against a variety of disorders that accompany cell death. Moreover, similar to when 5 screening disorder suppressor genes, by using samples containing polypeptides derived from patients suffering from a disorder that accompanies cell death, it is also possible to screen disorder suppressor polypeptides. The present inventor also tested suppressive effects on a disorder that accompanies cell death using 10 nucleic acids derived from patients suffering from the disorder and polypeptides encoded by the nucleic acids, as well as variants thereof. Similar tests are applicable to samples derived from patients suffering from other disorders that accompany cell death, thereby enabling the examination of disorder-suppressive effects. Genes and 15 polypeptides thus obtained by screening and testing can be used not only in the treatment of the disorder, but also as target molecules in the development of novel drugs. The present invention relates to a method of screening for a disorder suppressor gene or polypeptide, and a method for testing a disorder suppressor gene or polypeptide, 20 which are characterized by screening nucleic acids or polypeptides derived from organisms suffering from a disorder that accompanies cell death, and more specifically relates to:

(1) a method of screening for a disorder suppressor gene or a disorder suppressor polypeptide, comprising screening for a nucleic 25 acid or a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;

(2) a method of screening for a disorder suppressor gene, 30 wherein said method comprises the steps of:

(a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;

(b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder 35 due to the expression of the nucleic acid; and

(c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect;

(3) a method of screening for a disorder suppressor polypeptide or a disorder suppressor gene encoding said polypeptide, wherein said method comprises the steps of:

5 (a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;

10 (b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid; and

(c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect;

(4) the method according to any one of (2) or (3), comprising inducing the cell death associated with said disorder before, 15 or after step (a), and detecting the suppressive effect on the disorder in step (b) using the suppression of cell death as an index;

(5) a method according to any one of (1) to (4), wherein said disorder is a disorder of the cranial nervous system;

(6) the method according to (5), wherein said disorder of the 20 cranial nervous system is Alzheimer's disease;

(7) a method according to any one of (1) to (6), wherein said nucleic acid or polypeptide is derived from the nerve or brain;

(8) a method for testing a suppressive effect on a disorder, wherein said method comprises the steps of:

25 (a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area; and

(b) detecting in the cell the suppressive effect on the 30 disorder due to the expression of the nucleic acid;

(9) a method for testing a suppressive effect on a disorder, wherein said method comprises the steps of:

(a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell 35 death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the

disorder or from the vicinity of the affected area; and

(b) detecting in the cell the suppressive effect on the disorder due to the administration of the polypeptide;

5 (10) the method according to (8) or (9), comprising the inducing the cell death associated with said disorder before, or after step (a), and detecting the suppressive effect on the disorder in the step (b) using the suppression of cell death as an index;

(11) a method according to any one of (8) to (10), wherein said disorder is a disorder of the cranial nervous system;

10 (12) the method according to 11, wherein said disorder of the cranial nervous system is Alzheimer's disease; and

(13) a method according to any one of (8) to (12), wherein said nucleic acid or polypeptide is derived from the nerve or brain.

15 The present invention provides a method for screening disorder suppressor genes or disorder suppressor polypeptides, comprising screening nucleic acids or polypeptides derived from an organism suffering from a disorder that accompanies cell death. Furthermore, this invention provides a method for testing suppressive effects on a disorder using nucleic acids or polypeptides derived from an 20 organism suffering from the disorder. There is no limitation on the type of disorder to which the screening or testing method of this invention is applicable, as long as these disorders accompany cell death. Such disorders include those causing apoptosis and/or necrosis as well as those accompanying cell degeneration.

25 "Organism suffering from a disorder" includes organisms who show symptoms and also those who have not yet developed visible clinical symptoms but carry factors (or elements) that cause the disorder. In the present invention, for example, organisms having a mutation in a causative gene of a disorder, or aberration in its expression 30 are included in "organism suffering from a disorder". Moreover, animal models, and so on in which clinical symptoms have been artificially reproduced are also included. Such model organisms can be produced by administering factors causing a disorder of interest or by manipulating a causative gene, etc. "Organisms" in this 35 invention include whole organisms, and cultured organs and tissues isolated from organisms. These organisms may be genetically modified.

In addition, organs and tissues may be those transplanted to another individual.

Disorders for which the method of this invention is applicable are all disorders that accompany cell death as the main or a part 5 of the pathological features of the diseases. More specifically, for example, in neuronal disorders, included are all the neurodegenerative disorders, encephalitis or encephalopathy caused by exogenous factors such as viruses including HIV, encephalitis due to endogenous factors such as the autoimmune mechanism. Targeted 10 Neurodegenerative disorders may be further classified into two categories: in one category, neurodegeneration occurs in neurons in a specific region, while in the other, it occurs in neurons in an extensive region. For example, Parkinson's disease is caused by neuronal death in the substantia nigra of cerebral basal ganglia, 15 so it is a neurodegenerative disorder belonging to the former category. Additional examples of this category are Huntington's disease in which neuronal death occurs in putamen and corpus striatum of cerebral basal ganglia, retinitis pigmentosa accompanied with death of the retinal neurons, amyotrophic lateral sclerosis caused 20 by death of spinal neurons, and spinocerebellar degeneration accompanied with death of cerebellar neurons. Neurodegenerative disorders belonging to the latter category is represented by Alzheimer's disease, further including dementia with diffuse Lewy bodies, Pick's disease, or anterior temporal dementia, and, alcoholic 25 encephalopathy. Non-neurodegenerative disorders are represented by interstitial pneumonia with death of alveolar epithelial cells as its pathological feature, or fibroid lung, liver cirrhosis caused by death of hepatic parenchymal cells, and so on, also including nephrosclerosis, hypothyroidism, arterosclerosis, and so on.

30 Thus, although there is no particular limitation in the type of disorders for which the method of this invention is applied, as long as they are disorders accompanying cell death. The instant method is preferably used in searching for suppressor genes or suppressor polypeptides associated with cranial nervous system disorders in 35 particular. Disorders in the cranial nervous system mean those causing injuries in the brain and/or neuronal system. A typical

example is the above-described Alzheimer's disease. Research conducted so far have proved that neuronal death occurs in Alzheimer's disease (I. Nishimoto, et al., 1997, *Adv. Pharmacol.*, 41: 337-368). It has been suggested that activation of certain types of APP (I. Nishimoto, et al., 1998, *Neurobiol. Aging.*, 19: S33-S38) and presenilin (Nishimura, et al., 1999, *Clin. Genet.* 55: 219-225) are involved in these cell deaths. Involvement of ApoE has been also indicated (Namba, Y. et al., *Brain Res.* 541: 163-166 (1991); Saunders, A. M. et al., *Neurology* 43: 1467-1472 (1993); Corder, E. H. et al., *Science* 261: 921-923 (1993); Ueki, A. et al., *Neurosci. Lett.* 163: 166-168 (1993); Sorbi, S. et al., *Ann. Neurol.* 38: 124-127 (1995); Isoe, K. et. al., *Acta Neurol. Scand.* 94: 326-328 (1996)). Therefore, the method of this invention is preferably used in screening or testing of a disorder suppressor gene or disorder suppressor polypeptide for Alzheimer's disease. The method of this invention may be applied to both sporadic and familial Alzheimer's diseases.

Other than Alzheimer's disease, the method of this invention can also be used to screen or test genes or polypeptides that suppress cranial nervous system disorders caused by neuronal death, for example, for disorders caused by cerebral ischemia (may overlap with the above diseases) (T. Kirino, 1982, *Brain Res.*, 239: 57-69). Furthermore, the method of this invention can be applied also for the screening or testing of suppressor genes and suppressor polypeptides for other neurodegenerative disorders (Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205: 61-64 (1996)) such as Parkinson's disease with dementia (M. H. Polymeropoulos et al., 1997, *Science*, 276: 2045-2047), dementia with diffuse Lewy bodies (M. G. Spillantini et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6469-6473), frontal dementia, etc.; non-AD type dementia (Helisalmi, S. et al., *Neurosci. Lett.* 205: 61-64 (1996); Ji, Y. et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9: 243-245 (1998)) such as vascular dementia, dementia accompanying ischemic cerebrovascular disease, a type of alcoholic dementia (Muramatsu, T. et al., *J. Neural. Transm.* 104: 913-920 (1997)), dementia accompanying Down's syndrome, aging-associated hypomnesia (Blesa, R. et al., *Ann. Neurol.* 39: 548-551 (1996)), etc.

In the area affected by a disorder that accompanies cell death,

and in the vicinity of the affected area, tissues and cells highly susceptible to the disorder are destroyed due to cell death, leaving cells more resistant to the disorder behind. Therefore, suppressor genes or suppressor polypeptides for the disorders can be isolated

5 highly efficiently from samples collected from the affected area or its vicinity in such an organism. "the affected area or its vicinity" means the area or its vicinity showing disorder-associated alterations or clinical symptoms, and may also contain normal cells. For example, when the affected area is localized within an organ,

10 the organ as a whole may be referred to as a vicinity of the affected area. In the case of cerebral disorders where cell degeneration is observed, for example, in the frontal lobe, the brain as a whole including the occipital lobe is included in "the affected area or its vicinity."

15 There is no particular limitation in organs from which tissues of the affected area or its vicinity are collected, and any organ or tissue in which cell death is the clinical symptom of the disorder (for example, neuronal tissues in the case of neuronal disorders, lung tissues in the case of lung disorders) may be used. If a cDNA library is prepared from these tissues and cells, that library has condensed mRNA expressed in cells that have survived in the affected tissue. Furthermore, polypeptides of interest can be extracted according to standard methods known in the art from the tissues and cells.

25 When a difference in the clinical symptoms is observed in an affected area or its vicinity, samples are preferably prepared from tissues or cells that are as near to the affected area as possible, and those that have slight clinical symptoms. It is also preferable to prepare samples from tissues or cells collected from the normal

30 or nearly normal parts present in the affected organ, independent of the affected area. Such cells may be high in the expression level of disorder suppressor genes compared to other cells, so a highly efficient screening of disorder suppressor genes or polypeptides can be done. Slight clinical symptoms means that, in a disordered

35 organism, the level of symptoms in a particular area is slight compared to the most severely affected area. When multiple symptoms are seen

in association with a disorder, at least any one of them may be compared. For example, in organs or tissues in which cell death occurs as the pathological feature of a disorder, RNA is extracted from areas in which cells efficiently survive. For example, when a severe symptom 5 is observed in the cranial frontal cortex while the symptom in the occipital cortex or cerebellum is relatively slight, samples can be prepared from the latter tissues. In the example of this invention, for example, cDNA library has been constructed from occipital lobe where there is practically no neuronal damage within the cerebrum, 10 a principal site of neuronal death in AD. Similarly, in other disorders, RNA can be extracted from cells in the affected area or its vicinity to construct cDNA library.

Preparation of nucleic acids or polypeptides from tissues or cells can be performed according to the method well known in the art 15 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. press, 1989). In the present invention, "polypeptides derived from cells of an organism" include cell lysates or cell extracts, fractions thereof, crude or purified polypeptides, etc. Cell extracts may be appropriately fractionated using a suitable 20 fractionation method. Such methods well known in the art for fractionating or purifying proteins, include ammonium sulfate precipitation, cationic or anionic exchange chromatography, gel filtration, affinity chromatography, HPLC etc. Herein, polypeptides may be free or bound to a carrier. In this invention, "polypeptides" 25 mean peptides or proteins comprising two or more amino acid residues linked each other. Polypeptides also include short-chained ones usually called peptides, oligopeptides or oligomers. Polypeptides are not limited to those having relatively short chains, and include those having long chains such as those called proteins. They may be 30 polypeptides comprising, for example, 300 amino acid residues or more, 500 amino acid residues or more, or 1000 amino acid residues or more. That is, polypeptides as used herein include proteins.

Furthermore, in the present invention, "nucleic acids derived from cells in organisms" include nucleic acids obtained from organisms 35 and those synthesized from the nucleic acids, nucleic acids comprising those, and amplified products thereof. Nucleic acids include both

DNA and RNA, comprising, for example, DNAs prepared from organisms (e.g. chromosomal DNA or organelle DNA, etc.), transcriptional products thereof, RNAs prepared from organisms, cDNAs synthesized from the RNAs, fragments thereof, etc.. In addition, "nucleic acids 5 derived from organisms" include vectors containing these nucleic acids, and amplified products of the vectors. Preferably, mRNA prepared from cells is reversely transcribed to synthesize cDNA, which is inserted into an expression vector to construct the expression cDNA library. Synthesis of cDNA by the reverse transcription of RNA 10 and preparation of an expression library from cDNA can be carried out according to the method well known in the art (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, 2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. press, 1989). Examples of vectors used in the construction of an expression library 15 are plasmid vectors (e.g. pcDNA, pEF-BOS, etc.) and viral vectors, etc.

Screening of disorder suppressor genes or polypeptides are carried out by screening nucleic acids or polypeptides thus prepared. Herein, screening of nucleic acids means identification or selection 20 of candidate nucleic acids or fractions containing the same from nucleic acid samples or fractions containing the nucleic acids. Moreover, according to the present invention, it is also possible to test suppressive effects on disorders utilizing these nucleic acids or polypeptides.

For the extraction of RNA from tissues, in order to suppress 25 RNA degradation, it is necessary to collect a sample and prepare nucleic acid as rapidly as possible. In the method of this invention, nucleic acids may be simply prepared directly from cells in the affected area or its vicinity in an organism suffering from a disease, so that separation of specific cells from tissues by tissue staining 30 and cell sorting is not required. Therefore, suitable tissue can be immediately collected from such an organism so as to minimize nucleic acid degradation.

Nucleic acids or polypeptides used in the screening or testing 35 method of this invention may be combined with solvents or solutes to form compositions. For example, they may be appropriately dissolved in sterilized water, buffers, physiological saline, mediums,

serum, or solvents having combinations thereof. In these solutions a salt, protein, surfactant, preservative, and so on may be also dissolved, if necessary. In addition, nucleic acids can be combined with various transfection reagents such as LipofectAMINE (GIBCO BRL) 5 when transferred into cells.

The screening method of the present invention is characterized by the use of nucleic acids or polypeptides derived from cells in an area affected by a disorder that accompanies cell death, or in the vicinity of the affected area, of an organism suffering from the 10 disorder. It is expected that a library having condensed disorder suppressor genes can be constructed by preparing RNAs expressed in cells in the affected area, or in its vicinity. Similarly, a library having condensed disorder suppressor polypeptides may also be constructed by preparing polypeptides expressed in cells in the 15 affected area or its vicinity. Libraries thus constructed are applicable to the functional screening and other various screenings aimed at screening disorder suppressor genes or polypeptides. For example, when a gene or protein causing a disorder has been identified, the above-described library may be used to screen a disorder 20 suppressor gene or polypeptide that functions to normalize the expression and activity of the causative gene or protein as much as possible. For example, when a therapeutic effect can be expected by controlling the biochemical function of a causative protein of a disorder, it is effective to screen a library in which disorder 25 suppressor genes or polypeptides are thought to be condensed using the method of this invention and this biochemical function as an index. These screenings can be carried out utilizing well-known systems used in the analysis of a pathological feature of a disorder and functional 30 analysis of a causative gene of a disorder. Nucleic acids prepared from the affected area and its vicinity are appropriately incorporated into an expression vector and transferred to cells to detect their actions.

Screening of the present invention can be performed, for example, by detecting suppressive effects of test nucleic acids or polypeptides 35 on a disorder. This screening method is a method that screens suppressor genes or polypeptides using their suppressive effect as

an index, without focusing on the biochemical activity of the causative genes of the disorder. One of the screening methods comprises the following steps of:

- (a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;
- 5 (b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid; and
- 10 (c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect.

Alternatively, by a method comprising the following steps of:

- (a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;
- 15 (b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid; and
- 20 (c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect.

Furthermore, by similar processes as those described above, it is possible to examine suppressive effect of a test polypeptide and test nucleic acid, or a polypeptide encoded by said nucleic acid on disorder.

One of the testing methods comprises the following steps of:

- (a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area; and
- 25 (b) detecting in the cell the suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid.

Alternatively, one of the testing methods can be performed by a method comprising the following steps of:

- (a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the
- 30
- 35

disorder or from the vicinity of the affected area; and

(b) detecting in the cell the suppressive effect on the disorder due to the administration of the polypeptide.

Testing of a disorder suppressive effect can be performed by 5 assessing any of the target symptoms of the disorder and examining whether this symptom is suppressed by the expression of a test nucleic acid or administration of a test polypeptide. The assessed symptom may be either macroscopic or microscopic. For example, as a microscopic symptom, phenotype changes of cells and changes in the 10 expression level disorder-associated genes that occur in relation to a disorder can be also used as indexes of suppressive effects.

In the above-described screening or testing, there is no particular limitation on the type of host cells used for expression 15 of nucleic acids or administration of polypeptides, for example, mammalian cells can be used. There is no limitation on the type of mammalian cells, and non-human mammalian cells from mice, rats, rabbits, monkeys, and so on, as well as human cells can be used. Examples of mammalian cell lines used in general are CHO cell, COS cell, NIH3T3 cell, HEK293 cell, and so on. A cell line derived from 20 tissue equal to the one affected tissue by the target disorder may be used. For screening or testing suppressor genes or polypeptides for the cranial nervous system disorders, neurons are preferably used. Neurons include, for example, cells in the nervous system, cells derived from cells in the nervous system, nerve precursor cells, and 25 so on also including neuroblastoma, pheochromocytoma, teratoma, fusion cells formed using cells in the nervous system, fetal germinal cells, and so on. Examples of nerve cell lines usable in the method of this invention are F11 cells (D. Platika, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499; T. Yamatsuji, et al., 1996, Science, 272: 30 1349), SH-SY5Y cells (L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82), PC12 cells (L. A. Greene and A. S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428), NTERA2 cells (J. Skowronski and M. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054), P19 cells, and cells derived from these cells. As to NTERA2 cells and P19 cells, in 35 particular, cells in which nerve differentiation has been induced by treatment with retinoic acid are preferably used. Examples of

cells derived from F11 cells are F11/EcR cells (Y. Hashimoto et al., J. Biol. Chem. published on-line on August 3, 2000), F11/EcR/V642I cells (T. Niikura et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 442-447) (both, cf. examples). Primary neuronal cultures (for example, primary culture of the rat cerebral cortex) can be also used. Cellular expression of a nucleic acid can be performed by incorporating the nucleic acid into an expression vector and transferring the transformed vector into host cells. Administration of a polypeptide can be carried out by its adding it to the culture medium or injecting it into cells. Cells may be those within an individual. Expression of a nucleic acid in an individual may be carried out by administration of an expression vector containing the nucleic acid to the individual. As an expression vector, for example, viral vector can be used. As a viral vector, the well-known vector systems such as adenoviral vectors, retroviral vectors, etc can be utilized. Administration of polypeptides can be performed, besides the direct administration thereof into tissues or cells, through well known routes such as intravenous, oral, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administrations. Examples of organisms used in the screening or testing are non-human mammals such as mice, rats, rabbits, monkeys, etc. More specifically, a variety of disorder models constructed *in vivo* or *in vitro* may be applied to the method of the present invention. A number of such disorder models are known in the art.

As a result of detection, when the expression of a test nucleic acid or administration of a test polypeptide acts so as to suppress or normalize the onset, symptoms and/or progress of a disorder, the nucleic acid or polypeptide is assessed to have a suppressive effect on the disorder. Thus, nucleic acids or polypeptides found to have a significant suppressive effect on a disorder are assessed as genes or polypeptides having a suppressive effects on the disorder, respectively. In these tests, more detailed assays of the suppressive effect such as quantification thereof can be performed.

Effects of test nucleic acids or test polypeptides may be direct or indirect. For example, a nucleic acid or its expression product itself (RNA or polypeptide) may have a effect, and a nucleic acid

or its expression product may exert effects through acting on a different factor. These nucleic acids that can be isolated or selected by the screening method or testing method described above become disorder suppressor genes. In addition, a polypeptide that 5 can be isolated or selected by the above described screening method or testing method become a disorder suppressor polypeptide. Nucleic acid encoding the isolated polypeptide (disorder suppressor genes) can be obtained, for example, by screening genomic DNA and cDNAs using DNA probes and primers prepared based on the partial amino acid 10 sequences analyzed for the isolated polypeptide.

A screening or testing system for distinguishing disorder suppressive effects by cell death can be also constructed. This screening or testing method is a method performed solely relying on cell death itself, which is a pathological feature of a disorder, 15 as an index. In this screening or testing method, cell death associated with a disorder is induced in the above-described step (a) or before or after the step, and suppressive effect on the disorder is detected in step (b) using the suppression of the cell death as an index. In the following Example, using an Alzheimer's disease 20 (AD)-associated cell death-inducible cell system, the present inventors screened genes suppressing the cell death. In this method, a familial AD mutant amyloid precursor protein (APP) is expressed in neurons, and genes suppressing the cell death induced are screened. Induction of neuronal death is not limited to that by the expression 25 of V642I APP used in the Example, and can be performed by any desired treatment that induces cell death (cf. International Patent Publication No: WO00/14204 and International Patent Application No: PCT/JP00/02830). Furthermore, as described in Examples, polypeptides and genes isolated by the screening, polypeptides 30 encoded by the genes, derivatives thereof, and so on can be examined in detail for their suppressive effects on neuronal death induced by a variety of FAD genes and A $\beta$ .

As an example of a specific method, neurons (for example F11 cells) are transfected with only a vector expressing each of the FAD 35 genes: V642I/F/G APP, NL-APP, M146L PS-1 or N141I PS-2, or together with a vector expressing a nucleic acid to be tested. Alternatively,

cell death may be induced by the addition of  $A\beta$  (for example,  $A\beta$  1-43) to a primary neuronal culture (for example, a primary culture of rat cerebral cortex). Furthermore, cell death may be induced also by the addition of APP ligand (including APP antibody) or ApoER-1 ligands such as ApoE4. After culturing cells having a test nucleic acid expressed, cell mortality is measured. FAD genes can be conditionally expressed using an inducible promoter. When there is a statistically significant reduction in cell mortality induced under the condition in which a test nucleic acid is expressed compared with that induced under the condition in the absence of the test nucleic acid expression, this nucleic acid is assessed to have the disorder suppressive effect. In the case of using a polypeptide as a test sample, cell death is measured in the presence or absence of a sample containing this polypeptide. When there is a statistically significant reduction in cell death induced in the presence of a tested polypeptide compared with that induced in the absence of the polypeptide, this polypeptide is assessed to have a disorder suppressive effect. In the testing and screening of the action of a nucleic acid, instead of expressing a test nucleic acid, a polypeptide encoded by the nucleic acid to be tested is prepared beforehand, and cell death may be measured in the presence or absence of this polypeptide.

A screening or testing method that uses the suppression of cell death as an index is similarly applicable to disorders other than Alzheimer's disease. Disorder-associated cell death can be induced, for example, by administering a factor that reproduces the disorder of interest or by expressing a causative gene of the disorder. Specifically, for example, a system in which cell death is induced by expressing polyglutamine in neurons can be used (de Cristofaro, T. et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 272: 816-821). This system has been known as an experimental model of spinocerebellar ataxia (SCA) and Huntington's disease, and is applicable to the testing or screening of suppressor genes and polypeptides for these disorders in the present invention. Another example of an experimental disorder model is a system expressing SOD1 mutants (Silani, V. et al., 2000, J. Neurol. 247 Suppl. 1: 128-136), which

has been known as a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and screening of suppressor genes and suppressor polypeptides for this disorder also is a application object of the method of this invention. In addition, a system in which neurons are treated with 5 a partial peptide (116-126) of a prion (Thellung, S. et al., 2000, Int. J. Dev. Neurosci. 18: 481-492) is utilizable in this invention as a model of encephalopathy caused by prions. Moreover, a system in which pancreatic  $\beta$ -cells are treated with human amylin (Bai, J. Z. et al., 1999, Biochem. J. 343 Pt 1: 53-61) can be used as a model 10 of Type I diabetes mellitus. Furthermore, a system in which T cells such as Jurkat cells are treated with anti-Fas antibody (Li, X. K. et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 101-109) can be utilized as a model of fulminant hepatitis, and a system in which T cells are similarly treated with a T cell receptor antibody (Vito, 15 P. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 31025-31028) can be used as a model of autoimmune disorders. In addition, a system expressing a rhodopsin mutant (Liu, C. et al., 1999, J. Neurosci. 19: 4778-4785) is also an application object of the method in this invention as a model of retinitis pigmentosa. In these models, the detection or 20 screening of this invention can be carried out, for example, by transferring nucleic acids or polypeptides derived from an area affected by a disorder or the vicinity of the affected area of an organism suffering from the disorder, and detecting the cell death therein. There is no limitation on the origin of the nucleic acid 25 or polypeptide specimens, examples being those derived from tissues of patients, disorder model animals, or model culture systems, etc.

In the following Example, the present inventors examined the effect of HN peptide using a system of neuronal death induced by Q79, a polyglutamine with 72 repeats (Example 8). As described above, 30 polyglutamine Q79 is thought to be a causative of Huntington's disease (HD) and certain forms of spinocerebellar ataxia (SCA) (Ikeda, H. et al. (1996) Nat. Genet. 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) Curr. Opin. Neurol. 10, 285-290). Specifically, the present inventors have examined the suppressive effect of HN polypeptide by transfecting 35 F11/EcR cells with an ecdysone-inducible Q79 plasmid (pDN-E/G5H-Q79), and inducing neuronal death in the presence or absence of ecdysone

to examine the suppressive effect of HN polypeptide. A system equal to this can be used in the screening and testing of suppressor genes or suppressor polypeptides for Huntington's disease (HD) and spinocerebellar ataxia (SCA). That is, these screenings and testing 5. can be carried out by transfecting the above-described cells with an expression library constructed from mRNA prepared from the area affected by a disorder or the vicinity of the affected area to detect cell death.

Furthermore, the present inventors examined the effect of HN 10 peptide using a system of neuronal death induced by familial amyotrophic lateral sclerosis (familial ALS)-associated Cu/Zn-dependent superoxide dismutase (SOD1) mutants (Example 8). In this experiment, cell death was induced by mutant A4T, G85R, or G93A 15 of SOD1. By applying a similar system as this to the method of this invention, it is possible to perform testing and screening of suppressor genes or polypeptides for ALS. Similarly, screening and testing of this invention may be carried out using other disorder model systems.

Examples of methods for detecting cell death are cell number 20 counting, counting of viable cells by trypan blue exclusion assay, biochemical assay using MTT, etc. Cell death may be detected also by LDH release assay, and also by using a method for detecting apoptosis. Methods for detecting apoptosis are exemplified by the TUNEL method, DNA ladder method, method using an electron microscope, 25 or a method that relies on the detection of unique alterations of nuclei and cytoplasmic membrane, etc. Examples of the last method are those for measuring annexin V, morphological alterations of nuclei or caspase activity.

As a result of detection, when a significant cell 30 mortality-reducing effect is confirmed, test nucleic acids or polypeptides used in screening or testing are assessed to have a suppressive effects on a disorder of interest. In this case, a test nucleic acid or polypeptide need not completely inhibit cell death, but it is assessed to be effective when its capable of significantly 35 reducing the cell mortality compared to when the nucleic acid or polypeptide is absent.. Thus, disorder suppressor genes or disorder

suppressor polypeptides can be isolated or selected.

Genes and polypeptides isolated or selected by the above-described methods of the present invention are expected to be useful in the prevention and therapy of disorders. Disorder 5 suppressor genes can be amplified and expressed by inserting them into appropriate vectors. Such vectors may be utilized also for the purpose of gene therapy. As vector systems used in gene therapy, adenovirus vectors, AAV (adeno-associated virus) vectors, herpes virus vectors (all of these described in Robbins and Ghivizzani, 10 Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998), retrovirus vectors (Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999), lentivirus vectors (Lundstrom, K., 1999, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686), and so on may be utilized, but is not limited thereto. Furthermore, so far as the suppressive effect of interest is retained, the base sequence 15 of gene and amino acid sequence of polypeptide may be appropriately modified by a deletion, addition, insertion and/or substitution, and so on, respectively.

When the isolated gene encodes a peptide, the peptide can be produced by expressing the gene in appropriate hosts. There is no 20 particular limitation in the type of hosts used for the production of a polypeptide, and cells such as *E. coli*, yeast, mammalian cells, plant cells, insect cells, or individuals from which these cells are derived may be used. Host-vector systems are exemplified by the baculovirus-Sf cell system (Okamoto, et al., J. Biol. Chem. 270: 25 4205-4208, 1995), pcDNA-CHO cell system (Takahashi, et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995) CMV promoter plasmid-COS cell system (Yamatsuji, et al., EMBO J. 15: 498-509, 1996), and so on, but are not limited thereto.

Moreover, the above-described nucleic acids or polypeptides can 30 be artificially synthesized or modified to form derivatives. Herein, "derivatives" are molecules having the structures altered by a modification, addition, mutation, substitution or deletion of a functional group of a nucleic acid or polypeptide. Such alterations can be performed by methods well known in the art. Modifications of 35 functional groups are carried out aiming at, for example, the protection and stabilization of functional groups in the nucleic acid.

or polypeptide, or the control of migration to tissue or disorder-suppressing activity of the nucleic acid or polypeptide.

Nucleic acids or polypeptides thus isolated, or polypeptides encoded by the nucleic acids can be made into disorder-suppressing 5 reagents. A nucleic acid can be appropriately incorporated into a vector, and the resulting transformed vector can be used as a reagent. For a reagent comprising a nucleic acid or polypeptide, a nucleic acid or polypeptide can be used by itself, or by appropriately combining with sterilized water, physiological saline, a buffer, salt, 10 stabilizer, preservative, surfactant, another protein (such as BSA), transfection reagent (including lipofection reagent), etc. They may be mixed beforehand, or separately stored until mixed prior to use.

Furthermore, the above-described nucleic acids (or vectors) or polypeptides are used to prepare a pharmaceutical composition for 15 a disorder. As a pharmaceutical composition, a nucleic acid or polypeptide itself may be directly administered to patients, or may be formulated by pharmaceutical preparation methods well known in the art. For example, the composition may be administered after appropriately formulating it with pharmacologically acceptable 20 carriers or medium, specifically, sterilized water or saline, vegetable oils, emulsifiers, suspending agents, detergents, stabilizers, sustained-release preparations, and such. A pharmaceutical composition of this invention may be in the form of an aqueous solution, tablet, capsule, troche, buccal tablet, elixir, 25 suspension, syrup, nasal drop, inhalant solution, and such. The content of the polypeptide in these preparations makes a suitable dosage acquirable.

Administration to patients may be carried out depending on the properties of the used active ingredient. Example of suitable 30 administration methods include percutaneous, intranasal, transbronchial, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, intraspinal, intracerebroventricular, or oral administrations, but are not limited thereto. When using the pharmaceutical composition in the treatment of cerebral neurodegenerative diseases, it is 35 preferable to introduce the pharmaceutical composition to the central nervous system by an appropriate arbitrary route including a

intravenous, intraspinal, intracerebroventricular, or intradural injection. The dosage varies according to the age, body weight, condition of a patient, method of administration, and such, but one skilled in the art can suitably select them. The dosage and 5 administration method varies depending on the histological localization of the active ingredient of the pharmaceutical composition of the present invention, therapeutic purpose, body weight, age, and condition of a patient, and such, but can be selected suitably by those skilled in the art.

10

Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts a schematic illustration of the region in Humanin cDNA clone that encodes a polypeptide that antagonizes cell death caused by V642I APP.

15 DNA fragments were aligned with respect to the longest sequence (from -934 to 600; the number 1 nucleotide corresponds to the first nucleotide of Humanin ORF, and the nucleotide adjacent to it is numbered -1). Activities of the fragments against F11/EcR cell death induced by V642I APP are indicated under the item "rescue activity".

20 F11/EcR cells were transfected for 3 hours with pIND (1  $\mu$ g), encoding V642I APP, and 1  $\mu$ g of either pEF-BOS or pEF-BOS encoding each of the DNA fragments; and then, were treated with ecdysone for 72 hours. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay. A DNA fragment was determined to antagonize cell death (described as "Y" under the 25 item "rescue activity") when the mortality of cells transfected with the DNA fragment showed a statistically significant difference with that of cells transfected with pEF-BOS. "N" indicates the absence of such a significant antagonizing activity.

Figure 2 depicts a graph demonstrating the effects of DT63 clone 30 and DT171 clone on neuronal death caused by ecdysone-induced expression of V642I APP. F11/EcR cells were transfected with ecdysone-inducible V642I APP plasmid, and any one of pEF-BOS, DT63, or DT171 (DT63 and DT171 were cloned in pEF-BOS), and were treated with Ponasterone (ecdysone). A group without ecdysone treatment was 35 also set up. 72 hours after ecdysone treatment, cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Cell death of the group

without ecdysone treatment was measured similarly. The values with error bars in the graph represent mean  $\pm$ S.D. values of three independent transfection experiments. DT63 and DT171 are shown in Figure 1.

5 Figure 3 depicts a graph demonstrating the effect of DT63 clone on neuronal death induced by the expression of the FAD gene. F11 cells were transfected with pcDNA; or pcDNA encoding V642I APP, NL-APP, M146L PS-1, or N141I PS-2; and pEF-BOS (vec); or pEF-BOS encoding DT63; and were cultured for 72 hours. Cell death was measured by trypan 10 blue exclusion assay. The values with error bars in the graph indicate the mean  $\pm$ S.D. values of three independent transfection experiments.

Figure 4 depicts graphs indicating the effects of DT29, DT44, and DT171 clones on F11 cell death caused by FAD gene transfection. Similarly to Figure 3, F11 cells were transfected with pcDNA; or pcDNA 15 encoding either V642I APP, NL-APP, M146L PS-1, or N141I PS-2; and pEF-BOS (pBOS); or pEF-BOS encoding DT clone; and were cultured for 72 hours. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay. DT29 and DT44 are shown in Figure 1. Basal cell mortality (no transfection, pcDNA+ pBOS) was concordant in the three experiments 20 performed simultaneously. Similar experiments were performed at least three times. The values with error bars in the graph indicate the mean  $\pm$ S.D values.

Figure 5 depicts graphs demonstrating the effect of Humanin-encoding plasmid pHN on neuronal death induced by expression 25 of a FAD gene. F11 cells were transfected with an empty vector (pcDNA); or pcDNA encoding V642I APP, NL-APP, M146L PS-1, or N141I PS-2; and pFLAG; or pFLAG encoding HN (pHN); and were cultured for 72 hours. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay. The values are mean  $\pm$ S.D. values obtained by three independent 30 experiments.

Figure 6 depicts a graph demonstrating the suppressive effect of a culture supernatant from pHN-transfected F11 cells on neuronal death induced by V642I APP. F11 cells were transfected for 3 hours with either pcDNA or pcDNA encoding V642I APP, in the absence of serum; 35 cultured in HamF-12 containing 18% FBS for 2 hours; and cultured in CM/F11-pHN (CM/pHN), CM/F11-vec (CM/vec), or fresh media (fresh

HamF-12 containing 18% FBS) for 67 hours. 72 hours after the transfection, cell death was measured by trypan blue exclusion assay. The values are indicated as mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments.  $p < 0.01$ ; according to a Student's t test.

5 Figure 7 depicts photographs demonstrating the immunoreactivity of HN polypeptides contained in the culture supernatant of F11 cells transfected with pHN. The left and middle panels demonstrate the result of immunoblotting using anti-FLAG antibody on cell extracts (30  $\mu$ g protein) and culture supernatant (20  $\mu$ l) following Tris/Tricine 10 gel electrophoresis (lane 1: cells with no transfection; lane 2: pFLAG-transfected cells; lane 3: pHN-transfected cells). The right panel demonstrates the result of a similar analysis on the culture supernatant of cells transfected with pHN, pHNG, or pHNA. The 3 lanes on the right demonstrate the results of immunoblotting on sHN-FLAG 15 (MAPRGFSCLLLTSEIDL~~PV~~KRRAGTDYKDDDDK: the underlined region is a FLAG tag) (SEQ ID NO: 6) with indicated concentrations, to determine the titer of HN polypeptides contained in the culture supernatant. Similar experiments were repeated 4 times or more.

Figure 8 depicts graphs demonstrating the effect of synthetic 20 HN (sHN) and structural derivatives thereof on neuronal death induced by V642I APP. F11 cells were transfected with pcDNA encoding V642I APP; and were treated with various concentrations of sHN (Authentic HN) (SEQ ID NO: 5), shNG (S14G) (SEQ ID NO: 7), shNA (C8A) (SEQ ID NO: 8), dimer form of sHN through C8 (C8-C8), and sHN in which the 25 C-terminal KRRA was replaced with AAAA (KRRA21/22/23/24AAAA) (SEQ ID NO: 9). 72 hours after the transfection, cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments are indicated.

Figure 9 depicts graphs demonstrating the effect of sHN, shNG, 30 or shNA on neuronal death induced by M146L PS-1, N141I PS-2, or NL-APP. Similarly to Figure 8, F11 cells were transfected with M146L PS-1, N141I PS-2, or NL-APP cDNA; and were treated with various concentrations of sHN (Authentic HN), shNG (S14G), or shNA (C8A). 72 hours after the transfection, cell death was measured by trypan 35 blue exclusion assay. Mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments are indicated.

Figure 10 depicts graphs demonstrating the lack of effect of HN and structural derivatives thereof on neuronal death induced by polyglutamine repeat Q79. Mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments are indicated in the graphs.

5 Panel A: demonstrates the lack of the effect of pHN, pHNG, or pHNA on neuronal death caused by the expression of Q79 induced by ecdysone. F11/EcR cells were transfected with ecdysone-inducible type Q79 expression plasmid, and empty vector (pFLAG), pHN, pHNG, or pHNA, and were cultured for 72 hours in the presence (+) or absence 10 (-) of ecdysone. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay.

15 Panel B: demonstrates a significant suppressive effect by pHN co-transfection on neuronal death caused by ecdysone-induced expression of NL-APP, V642I APP, M146L PS-1, or N141I PS-2. Under the same conditions as in Panel A, F11/EcR cells were transfected with ecdysone-inducible FAD gene plasmid, and pFLAG or pHN, and then, 20 were cultured for 72 hours in the presence (+) or absence (-) of ecdysone. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay.

25 Panel C: demonstrates the lack of effects of sHN, sHNG, or sHNA on neuronal death induced by ecdysone-inducible expression of Q79. F11/EcR cells were transfected with ecdysone-inducible Q79 plasmids; treated with 1  $\mu$ M sHN, sHNG, or sHNA; and then, were cultured in the presence (+) or absence (-) of ecdysone. 72 hours after the initiation of the exdysone treatment, cell death was measured by trypan blue exclusion assay.

30 Panel D: demonstrates a significant suppressive effect by sHN on neuronal death caused by ecdysone-induced expression of NL-APP, V642I APP, M146L PS-1, or N141I PS-2. Under the same conditions as in Panel C, F11/EcR cells were transfected with ecdysone-inducible FAD gene plasmid; treated with 1 $\mu$ M sHN; and then, were cultured in the presence (+) or absence (-) of ecdysone. 72 hours after the initiation of the ecdysone treatment, cell death was measured by trypan blue exclusion assay.

35 Figure 11 depicts graphs demonstrating the lack of the effect of HN and structural derivatives thereof on neuronal death induced by the ALS-associated SOD1 mutants. Mean  $\pm$ S.D. values of three

independent experiments are indicated in the graphs.

Panel A: demonstrates the lack of the effect of pHN co-transfection on neuronal death induced by the expression of the ALS-related SOD1 mutants. F11 cells were transfected with pEF-BOS encoding the ALS-associated mutant SOD1 (A4T, G85R, or G93A mutants of SOD1) and empty vector (pFLAG) or pHN. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay.

Panel B: demonstrates the lack of the effect of sHN, sHNG, or sHNA on neuronal death induced by the expression of the ALS-associated SOD1 mutants. F11 cells were transfected with pEF-BOS encoding A4T, G85R, or G93A SOD1, and were treated with 100  $\mu$ M sHN, sHNG, or sHNA. Cell death was then measured by trypan blue exclusion assay.

Figure 12 depicts phase-contrast photomicrographs demonstrating the effect of HN on  $\text{A}\beta$ -induced cell death of primary cultured neurons. Representative photomicrographs are shown. Primary cultured cortical neurons were treated for 72 hours with 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$ 1-43 in the presence or absence of sHN (10 nM, 10  $\mu$ M), 10 nM sHNG, or 10  $\mu$ M sHNA. HN polypeptide was added 16 hours before the initiation of  $\text{A}\beta$ 1-43 treatment so that the final concentrations of the polypeptides were those indicated in the figure. Addition of  $\text{A}\beta$ 1-43 was performed by initially removing half of the media, and then supplementing with equal amounts of fresh media, containing 50  $\mu$ M  $\text{A}\beta$ 1-43 and sHN or sHNA at a concentration mentioned above. Untreated cells (no treatment), which were not treated with  $\text{A}\beta$ , were also observed. Similar experiments were performed at least 3 times, and reproducible results were obtained.

Figure 13 depicts graphs demonstrating the effect of HN on  $\text{A}\beta$ -induced cell death of primary cultured neurons. 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$ 1-43 was added to primary cultured cortical neurons in the presence (at indicated concentrations) or absence of sHN, sHNG, or sHNA. Addition of HN polypeptides was performed similarly to that described in Figure 12. 72 hours after the initiation of  $\text{A}\beta$  treatment, cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Primary cultured neurons treated similarly for 72 hours with 20  $\mu$ M etoposide in the presence or absence of 10  $\mu$ M sHN or HN derivatives were used as the positive controls in these experiments. Similar experiments were performed

at least three times, and reproducible results were obtained. Mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments are indicated in the graphs.

Figure 14 depicts a graph demonstrating the effect of HN on 5  $\text{A}\beta$ -induced cell death of primary cultured neurons. Cell damage was monitored as the amount of LDH released into the culture media. 25  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta1-43$  was added to primary cultured cortical neurons in the presence (at indicated concentrations) or absence of sHN, sHNG, or sHNA. Addition of HN polypeptides was performed similarly to that 10 described in Figure 12. 24, 48, or 72 hours after the initiation of  $\text{A}\beta$  treatment, the amount of LDH in the culture media was measured. LDH release from neurons treated with 20  $\mu\text{M}$  etoposide in the presence or absence of HN polypeptides was also measured. Similar experiments 15 were performed at least three times, and reproducible results were obtained. Mean  $\pm$ S.D. values of three independent experiments are indicated in the graph.

Figure 15 depicts photographs demonstrating the effect of HN on  $\text{A}\beta1-43$ -induced cell death of primary cultured neurons. The result 20 of Calcein-AM staining is demonstrated as fluorescence photomicrographs. 25  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta1-43$  was added to primary cultured cortical neurons in the presence (at indicated final concentrations) or absence of HN polypeptides. Addition of HN polypeptides was performed similarly to that described in Figure 12. 72 hours after  $\text{A}\beta1-43$  treatment, calcein-AM staining was performed. Untreated cells (no 25 treatment), that were not treated with  $\text{A}\beta$ , were also observed. Cytoplasmic fluorescence indicates cell viability. Similar experiments were performed at least three times, and reproducible results were obtained. Representative results are demonstrated in the figure.

30 Figure 16 depicts a graph demonstrating the result of fluorescence measurements of Calcein-AM staining. 25  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta1-43$  was added to primary cultured cortical neurons in the presence (at indicated final concentrations) or absence of HN polypeptides. Addition of HN polypeptides was performed similarly to that described 35 in Figure 12. Calcein-AM staining was performed after 72 hours from the  $\text{A}\beta1-43$  treatment, and fluorescence intensity of each well was

measured. The basal fluorescence intensity was calculated as 36960 (unit/well), and this was subtracted from the values measured for each well. Similar experiments were performed at least three times, and reproducible results were obtained. Mean  $\pm$ S.D. values of three 5 independent experiments are indicated in the graph.

Figure 17 depicts photographs demonstrating the expression of HN mRNA in various human tissues. Radiolabeled antisense HN (panel a), 19mer encoding the 5' region (panel b), or DT77 (panel c) was hybridized as a probe to the sheet blotted with human tissue polyA-RNA 10 (lane 1: brain; lane 2: heart; lane 3: skeletal muscles; lane 4: large intestine; lane 5: thymus; lane 6: spleen; lane 7: kidney; lane 8: liver; lane 9: small intestine; lane 10: pancreas; lane 11: lung; lane 12: peripheral leukocytes). The result of Northern blotting on the same sheet using  $\beta$ -actin as the probe is shown in panel d. The 15 numbers on the left indicate molecular sizes. Similar experiments were performed at least three times, and similar results were obtained.

Figure 18 depicts photographs demonstrating the expression of HN mRNA in mouse tissues. PolyA-RNA (2  $\mu$ g/lane) extracted from 20 various mouse organs was submitted to 1.2% agarose gel electrophoresis, and after blotting, hybridization was performed using labeled antisense HN (top left) or  $\beta$ -actin (lower left) as probes (lane 1: brain; lane 2: heart; lane 3: skeletal muscles; lane 4: thymus; lane 5: spleen; lane 6: kidney; lane 7: liver; lane 8: small intestine; 25 lane 9: stomach; lane 10: skin; lane 11: lung).

#### Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention will be described in detail using Examples 30 below, but the invention is not to be construed as being limited to these Examples. The experimental procedures described in these Examples are as follows:

V642I APP cDNA has been described previously (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352). The M146L mutant of PS-1 cDNA and the N141I mutant of PS-2 cDNA were gifts from Dr. Peter St. 35 George-Hyslop (Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375, 754-760) and Dr. Luciano D'Admio (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274,

1710-1713), respectively. All of the FAD genes used in the Examples were encoded in pcDNA vectors (Funk, C.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642). The ALS-associated mutant of SOD1 cDNA (A4T, G85R, G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) Acta Neuropathol. 88, 185-8), and pDN-E/G5H-Q79 were gifts from Dr. Shoji Tsuji, (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan), and Dr. Akira Kakizuka (Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan), respectively.

10 The pHN plasmids encoding Humanin were constructed by inserting HN cDNAs into the polycloning site of pFLAG-CMV-5a vectors (pFLAG) (Eastman Kodak). More specifically, pFLAG-CMV-5a plasmids were digested with EcoRI and KpnI, and the HN-encoding sense oligonucleotide

15 (5'-AATTCAACCAGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTTACTTTAACCAAGTGAAATTGACC TGCCCGTGAAGAGGCCGGCAGGTAC-3'/ SEQ ID NO: 1) and antisense oligonucleotide.

20 (5'-CTGCCCCGCTCTTCACGGGCAGGTCAATTCACTGGTTAAAAGTAAGAGACAGCTGAACC CTCGTGGAGCCATGGTG-3'/ SEQ ID NO: 2) were ligated. The plasmid expresses Humanin polypeptide fused with FLAG tag (DYKDDDDK) to the C-terminus.

25 The pFLAG plasmids (pHNG and pHNA), encoding mutant HN, were constructed from pHN using Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The sequence was confirmed by direct sequencing. Synthetic HN polypeptides (sHN) and structurally modified synthetic polypeptides purified to 95% or higher purity were used.

30 Synthetic HN (sHN) and several other synthetic HN-derived polypeptides were obtained from two independent sources, to obtain essentially the same results. Anti-FLAG antibody was purchased from Eastman Kodak (M2 monoclonal antibody, Cat. #IB13010). A $\beta$ 1-43 was purchased from BACHEM (Cat. #H-1586). Other reagents were all commercially available.

35 F11 cells (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503; Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352) were cultured in HamF-12 media containing 18% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. 7x10<sup>4</sup>/well of F11 cells were seeded into a 6-well plate; cultured in HamF-12 containing 18% FBS for 12 to 16 hours;

transfected 3 hours with plasmids encoding FAD genes and plasmids encoding HN (pHN, and such) by lipofection in the absence of serum (1  $\mu$ g of FAD cDNA expression plasmid, 1  $\mu$ g of HN cDNA expression plasmid, 4  $\mu$ l of LipofectAMINE, 8  $\mu$ l of Plus reagent); and then, were cultured 5 for 2 hours in HamF-12 media containing 18% FBS. Then, culture media were exchanged with HamF-12 media containing 10% FBS; and the cells were cultured for additional 67 hours. 72 hours after transfection, cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Experiments using synthetic HN polypeptides were conducted as follows: F11 cells 10 (at  $7 \times 10^4$ /well in a 6-well plate) were transfected 3 hours with FAD genes in the absence of serum, as mentioned above; after cultivation for 2 hours in HamF-12 media containing 18% FBS, the cells were cultured for 67 hours in HamF-12 media containing 10% FBS with various concentrations of HN polypeptides; and cell death was measured by 15 trypan blue exclusion assay. ALS-associated mutant cDNAs of SOD1 were also similarly transfected, and examined for their neurotoxicity.

To obtain the culture supernatant of F11 cells transfected with pHN (CM/F11-pHN), F11 cells were transfected with pHN in the absence 20 of serum by lipofection for 3 hours (1  $\mu$ g of pHN, 2  $\mu$ l of LipofectAMINE, 4  $\mu$ l of Plus reagent); and were cultured for 2 hours in HamF-12 media containing 18% FBS. Thereafter, the media was exchanged with HamF-12 media containing 10% FBS; and the cells were additionally cultured 25 for 67 hours. CM/F11-pHN was obtained by freeze-thawing the culture media once. CM/F11-vec was similarly prepared from pFLAG-transfected F11 cells. For immunoblot analysis of CM/F11-pHN, CM/F11-pHNG, and CM/F11-pHNA, protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Cat. #1697498; one tablet was dissolved in 2 ml of distilled water, and a volume 1/25 to that of the sample was 30 added to the sample) was added to the culture media that had not been freeze-thawed. For immunoblot analysis using cell lysates, the cells were washed twice with PBS, and were suspended in 30  $\mu$ l of homogenizing buffer [10 mM tris/HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 1 tablet/50 ml of protease inhibitor cocktail]. After two 35 freeze-thawing cycles, the cell homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 10 minutes at 4°C, and the supernatant was submitted to

immunoblot analysis with Tris/Tricine gel electrophoresis. Tris/Tricine gel electrophoresis was performed according to the literature (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Analytical Biochemistry 166, 168-179).

5 F11/EcR/V642I cells were established using ecdysone-inducible V642I APP expression plasmid. First, the co-expression vector pVgRXR was transfected into F11 cells (Invitrogen) and cells were subjected to Zeocin selection to establish F11 cells (F11/EcR cells) that stably overexpress both ecdysone receptor EcR and the retinoid X receptor 10 RXR. V642I APP cDNA was inserted into pIND vector (Invitrogen), having multiple copies of ecdysone responsive sequences; and after transfection of the vector into F11/EcR cells, G418 selection was performed. F11/EcR/V642I cells were cloned by limiting dilution. F11/EcR/V642I cells were cultured in HamF-12 media containing 18% 15 FBS and antibiotics. Before ecdysone treatment, the cells were cultured for 24 hours in the presence of 10% FBS. Then, ecdysone (40  $\mu$ M Ponasteron; Invitrogen Cat. #H101-01) was added to the cell culture media in the presence of 10% FBS. Cell death occurred to each F11/EcR/V642I cell, in response to ecdysone treatment; and the cell 20 mortality 72 hours after treatment in all cells was 60 to 70%, which reached 80 to 90% after 96 hours from the treatment. A more detailed analysis of F11/EcR/V642I cells is described elsewhere (see International Application No. WO00/14204).

F11/EcR cell experiment using ecdysone was conducted as follows: 25 F11/EcR cells were seeded at  $7 \times 10^4$ /well into a 6-well plate; cultured for 12 to 16 hours in HamF-12 media containing 18% FBS; and were similarly transfected in the absence of serum for 3 hours with 1  $\mu$ g of ecdysone-inducible plasmid alone, or with 1  $\mu$ g of HN-encoding plasmid, as mentioned above. After culturing for 12 to 16 hours in 30 HamF-12 media containing 18% FBS, the cells were cultured for 2 hours in HamF-12 media containing 10% FBS, then ecdysone (Ponasterone) was added to the media (final concentration of 40  $\mu$ M). Cell death was measured 72 hours after ecdysone treatment. Experiments using synthetic HN polypeptides were conducted as follows: cells were 35 similarly transfected for 3 hours with FAD genes in the absence of serum; cultured for 12 to 16 hours in HamF-12 media containing 18%

FBS; cultured for 2 hours in HamF-12 media containing 10% FBS and various concentrations of HN polypeptide; and then, 40  $\mu$ M Ponasterone was added to the media. Cell death was measured by trypan blue exclusion assay after 72 hours from the ecdysone treatment.

5 HD/SCA-associated Q79 cDNAs were also similarly transfected, and the neurotoxicity was tested.

Primary culture of mouse cortical neurons was performed in poly-D-lysine-coated 24-well plates (Sumitomo Bakelite) in the absence of serum and in the presence of N2 supplement, as described 10 in literature (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90). The purity of neurons prepared according to the method was >98%. The prepared neurons ( $1.25 \times 10^5$ /well, 250  $\mu$ l media/well) were preincubated in the absence or presence of 10 nM or 10  $\mu$ M sHN polypeptides for 16 hours; and were treated with 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$ 1-43 in the absence or presence 15 of sHN polypeptides at the same concentrations for 24 to 72 hours. Since primary cultured neurons are damaged even by temporary dryness during medium exchange, treatment of the cells by  $\text{A}\beta$ 1-43 was performed as follows. First, half of the volume of the old medium (125  $\mu$ l) was discarded. Then, 125  $\mu$ l of pre-warmed fresh medium containing 50  $\mu$ M 20  $\text{A}\beta$ 1-43 and sHN with a concentration indicated above were added to the culture.

Trypan blue exclusion assay was performed as follows. Without prewashing, the cells were suspended with gentle pipetting into a serum-free media. 50  $\mu$ l of 0.4% trypan blue solution (Sigma, Cat. 25 #T-8154) were added (final concentration of 0.08%) to 200  $\mu$ l cell suspension, and the suspension was mixed at room temperature. Within 3 minutes of the trypan blue solution addition, stained cells were counted. Cell mortality was determined [100-cell survival rate (%)] based on the stained cell count. LDH assay was performed using a kit 30 (LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601) by sampling 6  $\mu$ l of media in which neurons were cultured. Calcein staining was performed as described in literature (Bozyczko-Coyne, D. et al. (1993) Journal of Neuroscience Methods 50, 205-216). Specifically, 6  $\mu$ M Calcein-AM 35 (3',6'-Di-(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201)

was added to the neurons; and 30 minutes or longer after Calcein-AM treatment, fluorescence (ex = 490 nm, em = 515 nm) was observed by fluorescence microscopy, and measured by a spectrometer. Specific fluorescence was calculated by subtracting basal fluorescence from total fluorescence. Basal fluorescence was assigned to be the value calculated from linear trypan blue positivity-fluorescence intensity relationship, corresponding to 100% trypan blue positivity.

The assay was performed at least three times by repeating independent transfection or treatment. Student's t test was 10 performed as the statistical analysis.

Radiolabeling of oligonucleotides for Northern blot analysis was performed using Renaissance 3' end labeling system (NEN) with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). More specifically, 75 pmol of the probe oligonucleotide, 100 pmol of 3'-[<sup>32</sup>P]-dATP 15 (185TBq/mmol, NEN), and 36 units of TdT were incubated at 37°C for 30 minutes; and then, the labeled oligonucleotides were separated by gel filtration. 1x10<sup>6</sup> to 5x10<sup>6</sup> cpm/μl labeled probes were obtained according to the procedure. 5'-CTG CCC GCC TCT TCA CGG GCA GGT CAA TTT CAC TGG TTA AAA GTA AGA GAC AGC TGA ACC CTC GTG GAG CCA TGT GGT 20 G-3' (SEQ ID NO: 3) was used as the antisense HN. The cDNA fragment was radiolabeled using Ready-To-Go random labeling system (Amersham Pharmacia). Specifically, after incubation of 50 to 500 ng of denatured DNA fragments and 1.85 MBq[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP for 30 minutes at 37°C; the labeled DNA fragments were separated by gel filtration. About 25 5x10<sup>7</sup> cpm/μg DNA of labeled probes were obtained by the procedure. Northern blot analysis was performed using ExpressHyb (Clontech). More specifically, after prehybridization, membranes blotted with tissue polyA<sup>+</sup>-RNA (human tissue membranes obtained from Clontech; mouse tissue membranes obtained from Origene) were soaked with 30 radiolabeled probes (2 to 5x10<sup>7</sup> cpm) for 18 hours. After washing the membrane by two steps according to the directions, the membranes were exposed to X-ray films at -70°C using two intensifying screens.

[Example 1] Construction of cDNA expression library

35 According to the guidelines of the research institute, poly(A)<sup>+</sup>RNA was extracted from a brain sample (occipital cortex) of

a patient who was diagnosed through a biopsy to have sporadic Alzheimer's disease; the extracted poly(A)<sup>+</sup>RNA was incorporated into an expression vector to construct a cDNA expression library. As the expression vector, the mammalian cell expression vector pEF-BOS having the elongation factor promoter (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) was used. Poly(A)<sup>+</sup>RNA was reversely transcribed using a modified oligo-dT primer containing NotI site. Double-stranded cDNA was ligated with EcoRI-BstXI adaptor primers (5'-pGAA TTC ACC ACA-3' and 3'-CTT AAG GTGp-5'), and cleaved with NotI. After removing low molecular weight DNA, the cDNA was ligated with BstXI-NotI fragment of pEF-BOS, and transferred into the XL1 Blue MRF' strain by electroporation. The primary library size and the mean size of insert were  $3.2 \times 10^6$  cfu/16 ml and 0.9 kb, respectively.

15

[Example 2] Identification of Humanin

The F11 cell, established by fusing E17.5 rat primary cultured neurons and mouse neuroblastoma NTG18, is an immortalized cell model of primary cultured neurons (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503). Without a differentiation stimulus, the cell maintains typical characteristics of primary cultured neurons, such as the production of an activation potential (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503). The present inventor discovered that upon transfection of F11 cells with cDNA encoding V642I/F/G APP, i.e. three kinds of FAD causative genes, transient expression of V642 mutant APP causes cell death (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352). Accordingly, the present inventor used the recently developed ecdysone-inducible system (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) to construct F11 clones wherein the V642I APP is inducible. F11 cells wherein the expression of V642I APP can be induced were established as follows: first, F11 clones (F11/EcR) that overexpress both ecdysone receptor and RXR were established; and then, the cells were stably transfected with pIND-V642I APP, which encodes V642I APP cDNA that is expressed by an HSV promoter placed under the control of ecdysone responsive sequences. In their original form, F11/EcR/V642I clone

cells established as above hardly expresses V642I APP. However, conditional overexpression of V642I APP from the cells due to ecdysone treatment was confirmed. Furthermore, in response to ecdysone treatment, cell death was induced in all of the F11/EcR/V642I cells; 5 and cell mortality in all F11/EcR/V642I cells reached 60 to 70% after 72 hours from the treatment, and 80 to 90% after 96 hours from the treatment.

Using these cells, and basically following the method developed by D'Adamio et al. (D'Adamio, L. et al. (1997) *Semin. Immunol.* 9, 10 17-23), "death trap screening" was performed using a modified version of the method of D'Adamio et al. In the originally described "death trap screening", Vito et al. transfected Jurkat cells with normal T-cell cDNA library; induced cell death by stimulating T-cell receptors; and collected genes that antagonize cell death. The 15 present inventor performed death trap screening in order to screen genes that antagonize cell death induced by AD genes. The cDNA expression library comprising cDNAs prepared as described above from the brain sample of a patient with AD was transfected into F11/EcR/V642I cells, which were treated with ecdysone for 72 h, and 20 then the plasmids were recovered from the surviving cells. The procedure was repeated 3 times, and ultimately, plasmids of about 250 clones were obtained. The clones were categorized into 36 groups that cross hybridize to each other by dot blot hybridization using 25 respective plasmids. The largest group comprised 28 clones.

Focusing on this group of cDNAs, the present inventor sequenced all the clones. As a result, clones belonging to this group generally consisted of a cDNA having a fused sequence of 1535 bp; specifically, 30 5' sequence homologous to the non-coding region of Wnt-13, a 3' sequence homologous to the mitochondrial 16S ribosomal RNA, and a poly(A) region at the C-terminus. The entire sequence was novel (Figure 1). After sequencing each clone, whether the transient transfection of respective clones significantly suppresses cell death induced by ecdysone in F11/EcR cells co-transfected with pIND-V642I APP was assayed. As a result of comparing the sequences which 35 demonstrated a cell death suppression activity, an antagonizing activity against cell death induced by V642I APP was found to be

encoded by a 75 bp open reading frame (ORF) (5'-ATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTTACTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCGTG AAGAGGCGGGCATGA-3' /SEQ ID NO: 4) encoding a novel 24-amino acid polypeptide "MAPRGFSCLLLTSEIDLGVKRRA" (SEQ ID NO: 5). The present  
5 inventor dubbed the molecule Humanin (HN).

[Example 3] Suppressive effect of respective clones on cell death induced by FAD genes

Figures 2 to 4 demonstrate the effects of co-transfection of  
10 respective clones belonging to this group. When F11/EcR cells (F11 clone stably expressing EcR and RXR, wherein the expression of genes encoded by pIND plasmid are induced by ecdysone) were transiently transfected with pIND encoding V642I APP in the absence of ecdysone (non-V642I APP inducing conditions), 72 hours later, cell death  
15 occurred in about 20% of the cells, whereas cell death occurred in a significantly high proportion (50 to 60%) of cells in the presence of ecdysone (V642I APP inducing conditions) (Figure 2). F11/EcR cells transfected with DT63-encoding pEF-BOS, in addition to V642I APP-encoding pIND, demonstrated no significant increase of cell death  
20 induced by ecdysone even in the presence of ecdysone. On the other hand, cells transfected with pEF-BOS or pEF-BOS encoding DT171, demonstrated significant increase in cell death in response to ecdysone. Figure 3 demonstrates the result confirming the effect of DT63 on neuronal death induced by the four FAD genes (V642I APP, NL  
25 APP, M146L PS-1, and N141I PS-2), respectively, using simple transient transfection. When F11 cells were co-transfected with empty pEF-BOS in addition to the pcDNA encoding any one of FAD genes (V642I APP, NL APP, M146L PS-1, or N141I PS-2), incubation for 72 hours lead to cell death in 50 to 70% of the cells. The transfection efficiency  
30 under this condition was about 60 to 70%, which indicates that cell death occurred after 72 hours from transfection in most of the cells expressing one of the FAD genes. Increase in cell death was dramatically suppressed by transfecting F11 cells with DT63-encoding pEF-BOS in addition to one of the FAD genes. This indicates that,  
35 DT63 cDNA antagonizes cell death induced by the four AD genes with a high efficiency. Figure 4 demonstrates the effect of other DT clones

that contain the entire HN sequence, and other DT clones that do not contain the entire sequence (DT29, DT44, and DT171 cDNA). Although marked suppression of cell death induced by each of the FAD genes was demonstrated with DT29 and DT44, which are clones encoding the 5 entire HN sequence, action of antagonizing cell death could not be confirmed with DT171 lacking the first ATG codon of HN. These data indicate that the ORF encoded by HN protects neurons from cell death caused by all four FAD genes.

Therefore, the present inventor subcloned HN cDNA into the pFLAG vector (pHN), and directly investigated the effect of pHN towards neuronal death caused by each of the FAD genes, V642I APP, NL-APP, M146L PS-1, and N141I PS-2. As expected, transfection of pHN into F11 cells hardly showed toxicity, and furthermore, detoxified the toxicity by the FAD genes (Figure 5). The antagonizing activity is 10 not the result of suppression of the expression of respective FAD genes by pHN. This is verified by the fact that co-transfected pHN doesn't change the expression of FAD genes expressed from the CMV promoter, which was indicated from the finding that pHN co-transfection didn't change the expression of EGFP expressed from 15 the CMV promoter (data not shown). Furthermore, immunoblotting of V642I APP, NL-APP, and N141I PS-2 confirmed that co-transfection of pHN hardly has any effect on the expression of these genes (data not 20 shown).

25 [Example 4] Extracellular secretion of HN

In the course of experiments, the culture supernatant of F11 cells transfected with pHN (CM/F11-pHN) was demonstrated to significantly suppress cell death induced by FAD genes encompassing V642I APP. Cell death was induced at high rates in F11 cells 30 transfected with V642I APP cDNA under the presence of fresh media or culture supernatant of F11 cells transfected with empty pFLAG vector (CM/F11-vec), but in contrast, under the presence of CM/F11-pHN, cell death decreased dramatically in F11 cells transfected with V642I APP cDNA (Figure 6). Similar results were obtained with DT clones. 35 Complete suppression of V642I APP-induced cell death of F11 cells was observed with CM/DT29 and CM/DT63, but not with CM/DT171. The

result indicates that HN polypeptides transcribed from HN or cDNA encoding HN are secreted into the culture media to suppress cell death induced by V642I APP. Figure 7 demonstrates the result of investigation on immunoreactivity of HN in CM/F11-pHN using anti-FLAG antibodies. CM/F11-pHN and the lysate of cells transfected with pHN showed a single band at 3 to 4 kDa, indicating immunoreactivity of HN, the size of which concordant with the expected molecular weight for FLAG-fused HN (3837 Da; Figure 7, left and center panels). Concentration determination using synthetic FLAG-fused HN polypeptide (MAPRGFSCLLLTSEIDL~~PVKRRAGTDYK~~KKDDDK: Flag tag is underlined) (SEQ ID NO: 6) demonstrated that HN is present in CM/F11-pHN at a concentration of 8 to 9  $\mu$ M (Figure 7, right panel). These findings indicate that HN is transcribed from pHN and is secreted into the culture supernatant.

15

[Example 5] Suppressive effect of synthetic HN polypeptide on cell death induced by V642I APP

Next, the present inventor synthesized a synthetic HN polypeptide MAPRGFSCLLLTSEIDL~~PVKRRAGTDYK~~KKDDDK (SEQ ID NO: 5), and investigated its action on neuronal death induced by V642I APP by adding the polypeptide extracellularly. Cell death induced by V642I APP was dramatically suppressed by transfecting F11 cells with V642I APP cDNA and culturing the cells in the presence of 10  $\mu$ M synthetic HN polypeptide (sHN) (Figure 8). Only an extremely weak suppression was indicated at 10 nM sHN. The suppressive action was dependent on the concentration of sHN added, and at the level of 1 to 10  $\mu$ M polypeptide, complete suppression could be achieved. IC<sub>50</sub> value was about 100 nM. The dose-dependent curve agrees with the fact that HN secreted at a level of about 10  $\mu$ M into CM/F11-pHN effectively suppressed cell death induced by V642I APP.

[Example 6] Suppressive effect of HN polypeptide and structural derivatives thereof on cell death induced by V642I APP

The present inventor further examined whether the cell death suppressive action of sHN is dependent on the specific primary structure (Figure 8). A complete antagonizing effect on cell death

induced by V642I APP could be observed at a concentration of 10 nM or less with S14G (MAPRGFS~~C~~LLLTGEIDL~~P~~VKRRA: the underlined G replaces S; called HNG) (SEQ ID NO: 7) as the polypeptide, and IC<sub>50</sub> of the polypeptide was about 100 pM. In contrast, C8A HN polypeptide 5 (MAPRGFS~~A~~LLLTSEIDL~~P~~VKRRA: underlined A replaces C; called HNA) (SEQ ID NO: 8) did not significantly suppress cell death induced by V642I APP at concentrations up to 100  $\mu$ M. The importance of Cys at position 8 was also suggested from the result obtained using an HN dimer (C8-C8 HN), bound through Cys at position 8. The antagonizing action level 10 of C8-C8 HN was in between those of the original HN and HNA. On the contrary, a derivative wherein the HN C-terminal KRRA was substituted with AAAA (SEQ ID NO: 9) indicated similar functional activity to the original HN polypeptide. These results indicate that the primary structure has a fundamental role in the suppression activity of HN, 15 and that particular amino acid residues have a predetermined role.

[Example 7] Suppressive effect of HN polypeptides and structural derivatives thereof on cell death induced by FAD genes

Next, the effect of sHN, synthetic HNG (sHNG), and synthetic 20 HNA (sHNA) on cell death induced by other FAD genes, more specifically, those induced by NL-APP, M146L PS-1, and N141I PS-2 was investigated. As indicated in Figure 9, the original sHN demonstrated similar dose-responsiveness on cell death induced by any of the three FAD genes, and blocked neuronal death induced by the FAD genes at a 25 concentration of 1  $\mu$ M. Up to a concentration of 100  $\mu$ M, sHNA did not antagonize cell death by any of the FAD genes. In contrast, sHNG completely suppressed cell death caused by any of the FAD genes at a concentration of 10 nM or less. This indicates that the action of HN is enhanced 100 to 1000 fold by S14G substitution. Taking the 30 action of sHNG on cell death induced by V642I APP (Figure 8) together, sHNG at a concentration of 10 nM or less, completely antagonizes neuronal death induced by all of the four different types of FAD genes.

[Example 8] Specificity of the cell death suppressive effect of HN

35 To elucidate the specificity of HN action, the ability of HN cDNA or HN polypeptide to antagonize cell death induced by causative

genes of other neurodegenerative diseases was investigated. Polyglutamine Q79, having 72 repeats, is considered to be the cause of Huntington's disease (HD) and certain types of spinocerebellar ataxia (SCA) (Ikeda, H. et al. (1996) *Nat. Genet.* 13, 196-202; Kakizuka, 5 A. (1997) *Curr. Opin. Neurol.* 10, 285-90). In accordance with the report that Q79 expression causes neuronal death, F11 cells underwent cell death due to the expression of Q79 (Figure 10). Examination of neurotoxicity was carried out in the presence or absence of ecdysone by transfecting F11/EcR cells with Q79 plasmid, the expression of 10 which is induced by ecdysone (pDN-E/G5H-Q79). In this system, cell mortality markedly increased in response to ecdysone treatment when F11/EcR cells were transfected with pDN-E/G5H-Q79 together with the empty vector (pFLAG) (Figure 10A). Similarly, high proportions of cell death of F11/EcR cells, transfected with pDN-E/G5H-Q79 together 15 with pHN, pHNG, or pHNA, were induced by ecdysone treatment. Further, F11/EcR cell death caused by ecdysone-induced expression of any of the FAD gene was effectively suppressed by the co-transfection of pHN (Figure 10B). Cell death induced by Q79 was not suppressed in the experiment using sHN (Figure 10C). Extensive cell death was 20 caused by ecdysone when F11/EcR cells were transfected with pDN-E/G5H-Q79, even in the presence of sHN, shNG, or shNA at a concentration of sHN or shNG that enables complete suppression of F11/EcR cell death caused by any one of the 4 types of FAD genes, just as in the absence of sHN, shNG, or shNA (Figure 10D).

25 Additionally, the present inventor investigated the effect of HN on neuronal death induced by mutants of Cu/Zn-dependent superoxide dismutase (SOD1), i.e. A4T, G85R, or G93A, associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (familial ALS). In accordance with previous reports reporting that expression of familial ALS-associated 30 SOD1 mutants cause cell death of mammalian neurons (Rabizadeh, S. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) *J. Neurosci.* 17, 8756-66), significant cell death was induced with all of the mutants by transfecting F11 cells with a cDNA that expresses one of the mutants. Further, a similar high 35 cell mortality was induced when F11 cells were co-transfected with pHN in addition to each SOD1 mutant gene (Figure 11A). As demonstrated

in Figure 11B, cell death caused by one of the familial ALS-associated SOD1 mutants couldn't be suppressed with 100  $\mu$ M of any of sHN, shNG, or shNA. These data suggest that HN activates the intracellular mechanism for suppressing the cell death execution mechanism triggered by the FAD genes, but does not function on cell death caused by other neurodegenerative disease genes, and verify that the antagonizing effects of HN cDNA and HN polypeptides are common and specific to neuronal death associated with AD.

10 [Example 9] Suppressive effect of HN on cell death of primary neuronal culture

The present inventor examined the protection of primary cultured neurons by HN from damages associated with AD.  $\text{A}\beta$  is the major peptide component of senile plaque and an extracellular deposit that pathologically characterizes an AD brain, and is suggested to be associated with the pathological mechanism of AD (Selkoe, D. J. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) Neurology 51, S2-17; discussion S65-67).  $\text{A}\beta$  treatment has been reported to induce cell death of primary cultured neurons (Loo, D. T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7951-7955; Gschwind, M. and Huber, G. (1995) J. Neurochem. 65, 292-300). As demonstrated in Figure 12, extensive cell death accompanied by dystrophic neuritic changes of the axon was induced in primary cultured cortical neurons treated with 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$ 1-43 for 48 to 72 hours in the presence or absence of N2 supplement. Cell death induced by  $\text{A}\beta$ , as well as dystrophic neuritic changes of the axon were dramatically suppressed in primary cultured neurons pre-treated with 10  $\mu$ M sHN. Cell death (measured by trypan blue exclusion; Figure 13, left panel) and cell damage (measured by LDH released from the cells; Figure 14) was observed by the treatment with  $\text{A}\beta$ 1-43. These indices of cell survival (i.e., cell death and cell damage) were completely restored to a level observed under basal conditions by the treatment with 10  $\mu$ M sHN. Under the same conditions, 100 ng/ml of NGF did not show effects to antagonize increased LDH release and cell death of neurons induced by  $\text{A}\beta$  (data not shown). In spite of the fact that sHN demonstrated a dramatic effect in antagonizing neuronal death induced by  $\text{A}\beta$ ,

similar treatment of neurons with 10  $\mu$ M sHN could not prevent the toxic effect of 20  $\mu$ M etoposide on primary cultured neurons (Figure 13, right panel; and Figure 14). Etoposide is an anticancer agent and has been reported to induce cell death of primary cultured neurons

5 (Nakajima, M. et al. (1994) Brain Res. 641, 350-2). These findings support the idea that HN antagonizes neuronal death induced by  $\text{A}\beta$ 1-43 by a selective mechanism. As indicated in the experiment of FAD genes using F11 cells, 10 nM sHNG completely protected cells from cell death and dystrophic neuritic changes of the axon caused by  $\text{A}\beta$ 1-43, but 10

10 nM sHN or 10  $\mu$ M sHNA both did not show any effect against neurotoxicity of  $\text{A}\beta$  (Figure 12). The result was confirmed not only by the LDH release assay (Figure 14), which is an assay of cell damage, and by trypan blue exclusion assay (Figure 13), but also by Calcein staining assay

15 (Figure 15 and 16), which is an assay of viable cells. Thus, HN was shown to have similar effects on primary cultured neurons as on cloned neurons. Furthermore, these data suggest the existence of a receptor (group of receptors) that specifically recognizes the HN structure, common between F11 cells and primary cultured neurons.

20 [Example 10] Expression of HN mRNA

Using  $\beta$ -actin mRNA as a positive control, expression of HN mRNA in various tissues were examined. From Northern blot analysis of human tissues, remarkable HN mRNA expression was detected in the heart, skeletal muscles, kidneys, and liver (Figure 17a). Although less than in those tissues above, a significant expression was detected in the brain and in the gastrointestinal tract. In the immune system, including the thymus, spleen and peripheral leukocytes, mRNA was hardly detected. The size of the mainly expressed mRNA was about 1.6 kb which corresponds to the size expected for the longest DT cDNA comprising HN. Additionally, mRNAs of different sizes of about 3 kb and about 1 kb were also detected. Similar results as those mentioned above were obtained and all of the bands were detected when DT77, encoding the 3' region of HN but not the HN (see Figure 1), or an antisense primer (GGGTGTTGAGCTTGAACGC/ SEQ ID NO: 10) against the 35 5' region, -440 to -422, of HN was used as a probe. Thus, the mRNAs are expected to be full length HN mRNA and splicing variants thereof.

The present inventor isolated several cDNAs from human heart cDNA library. The size of the isolated cDNAs exceeded 1 kbp, and the positions of the cDNAs were substantially the same as those of DT44. Similar results, except for the differences mentioned below, were 5 obtained in mouse tissues (Figure 18). A difference was that the skeletal muscle and liver of mouse had lower levels of HN mRNA compared to human tissues. However, quantitative differences seemed to be affected by conditions of the individuals, since the HN mRNA level was higher in skeletal muscles and liver of other mice (data not shown). 10 Another difference was that the small 1 kb mRNA was expressed at an amount comparable or greater to the amount of the 1.6 kb mRNA in mouse heart and kidneys. Further, an additional mRNA of about 0.4 kb was specifically expressed in mouse brain, heart, and skeletal muscles. Detailed analysis of the expression regions in the brain revealed 15 that comparatively large amounts of mRNA were expressed in the cerebellum and in the occipital lobe among the brain regions. These results indicate that HN mRNA is mainly produced in organs other than the central nervous system. Therefore, HN is possibly secreted into the blood stream, and is transported to the cranial nerves. 20 Alternatively, locally synthesized HN in the brain may exhibit a protective action. It is interesting to note that most of the HN mRNA is synthesized in the cerebellum and occipital lobe, which are regions demonstrating strongest resistance against neuronal death in AD brains.

25

#### Industrial Applicability

The present invention provides a method for screening suppressor genes or suppressor polypeptides for a disorder, which is characterized by screening nucleic acids or polypeptides derived from 30 an organism suffering from a disorder that accompanies cell death. Use of a sample derived from organisms suffering from such a disorder enables the efficient cloning of suppressor genes or polypeptides for the disorder. Furthermore, the examination of suppressive effects of nucleic acids and polypeptides derived from organisms 35 suffering from a disorder that accompanies cell death, as well as polypeptides encoded by the nucleic acids, allows the analysis of

the characteristics of the nucleic acids and polypeptides.

## CLAIMS

1. A method of screening for a disorder suppressor gene or a disorder suppressor polypeptide, comprising screening for a nucleic acid or a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area.

2. A method of screening for a disorder suppressor gene, wherein said method comprises the steps of:

(a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;

(b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid; and

(c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect.

3. A method of screening for a disorder suppressor polypeptide or a disorder suppressor gene encoding said polypeptide, wherein said method comprises the steps of:

(a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area;

(b) detecting in the cell a suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid; and

(c) selecting the nucleic acid having the suppressive effect.

4. The method according to any one of claims 2 or 3, comprising inducing the cell death associated with said disorder before, or after step (a), and detecting the suppressive effect on the disorder in step (b) using the suppression of cell death as an index.

5. A method according to any one of claims 1 to 4, wherein said disorder is a disorder of the cranial nervous system.

6. The method according to claim 5, wherein said disorder of the cranial nervous system is Alzheimer's disease.

7. A method according to any one of claims 1 to 6, wherein said nucleic acid or polypeptide is derived from the nerve or brain.
8. A method for testing a suppressive effect on a disorder, wherein said method comprises the steps of:
  5. (a) expressing in a cell a nucleic acid derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area; and
  - (b) detecting in the cell the suppressive effect on the disorder due to the expression of the nucleic acid.
9. A method for testing a suppressive effect on a disorder, wherein said method comprises the steps of:
  - (a) administering to a cell (i) a polypeptide derived from a cell of an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, or (ii) a polypeptide encoded by a nucleic acid derived from said cell, wherein said cell is derived from an area affected by the disorder or from the vicinity of the affected area; and
  - (b) detecting in the cell the suppressive effect on the disorder due to the administration of the polypeptide.
- 20 10. The method according to claim 8 or 9, comprising the inducing the cell death associated with said disorder before, or after step (a), and detecting the suppressive effect on the disorder in the step (b) using the suppression of cell death as an index.
11. A method according to any one of claims 8 to 10, wherein 25 said disorder is a disorder of the cranial nervous system.
12. The method according to 11, wherein said disorder of the cranial nervous system is Alzheimer's disease.
13. A method according to any one of claims 8 to 12, wherein said nucleic acid or polypeptide is derived from the nerve or brain.

## ABSTRACT

The present invention provides methods for screening and testing disorder suppressor genes and disorder suppressor polypeptides. By 5 screening the cDNA expression library incorporated with nucleic acids derived from an organism suffering from a disorder that accompanies cell death, genes having suppressive effects on the disorder symptoms were successfully cloned. Furthermore, suppressive effects of the nucleic acid and polypeptide encoded by the nucleic acid on the 10 disorder have been also examined. Screening of nucleic acids or polypeptides derived from an organism suffering from a disorder that accompanies cell death enables the efficient isolation and selection of suppressor genes of the disorder.